

Клиническая генетика. Геномика и протеомика наследственной патологии

Библиография Клиническая генетика. Геномика и протеомика наследственной патологии [Электронный ресурс] : учебное пособие / Мутовин Г.Р. - 3-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. - <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970411520.html>

Авторы Мутовин Г.Р.

Издательство ГЭОТАР-Медиа

Год издания 2010

ПрототипЭлектронное издание на основе: Клиническая генетика. Геномика и протеомика наследственной патологии: учебное пособие. Мутовин Г.Р. 3-е изд., перераб. и доп. 2010. - 832 с.: ил. - ISBN 978-5-9704-1152-0.

Оглавление

БЛАГОДАРНОСТЬ СОТРУДНИКАМ НАУЧНЫХ И ПЕДАГОГИЧЕСКИХ КОЛЛЕКТИВОВ, КОЛЛЕГАМ ПО РАБОТЕ И РЕЦЕНЗЕНТАМ	8
ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА.....	8
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	9
ЧАСТЬ 1 ВВЕДЕНИЕ В ГЕНОМИКУ И ПРОТЕОМИКУ. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ПОЛОЖЕНИЯ. НАСЛЕДОВАНИЕ ГЕНОВ И ПРИЗНАКОВ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМА. МЕТАБОЛИЗМ И ПУТИ УПРАВЛЕНИЯ. ПОВРЕЖДЕНИЕ И ГИБЕЛЬ КЛЕТКИ. ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ КЛЕТКИ ГЛАВА 1 ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРЕДМЕТЕ.....	13
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕДМЕТА ГЕНЕТИКИ	13
ИСТОРИЯ И ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ ГЕНЕТИКИ	13
ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТКИ И РАЗВИТИЯ ЦИТОГЕНЕТИКИ	17
ПЕРСПЕКТИВЫ РАСШИФРОВКИ ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК.....	25
ГЕНОМНОЕ И ПРОТЕОМНОЕ ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА	27
КОНЦЕПЦИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРОТЕОГЕНОМИКИ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ.....	29
ГЛАВА 2 СТРУКТУРНАЯ ГЕНОМИКА ОРГАНИЗАЦИЯ НАСЛЕДСТВЕННОГО МАТЕРИАЛА	30
СТРОЕНИЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК	31
СТРОЕНИЕ И ТИПЫ МОЛЕКУЛЫ РНК	33
МОЛЕКУЛА ДНК - ГЛАВНАЯ МОЛЕКУЛА ЖИЗНИ	33
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД	33
ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ СТРУКТУРНОЙ ГЕНОМИКИ	49
ГЕНОТИП И ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ	55
ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО РАЗМЕРЫ.....	57
ГЛАВА 3 ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА (ПРОТЕОМИКА) ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ	59
БЕЛКИ КАК РЕЗУЛЬТАТ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ	65
ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ПРОТЕОМИКИ.....	75
ГЛАВА 4 НАСЛЕДОВАНИЕ ГЕНОВ И ПРИЗНАКОВ.....	80
ВАРИАНТЫ И ТИПЫ НАСЛЕДОВАНИЯ ГЕНОВ И ПРИЗНАКОВ	82
ПОКАЗАТЕЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПОНЯТИЯ ГЕНОМИКИ И ПРОТЕОМИКИ.....	90
МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ОТДЕЛЬНЫМ ГЕНОМ И ГЕНОТИПОМ	95
ГЛАВА 5 ИЗМЕНЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМА	100
ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ТЕОРИИ МУТАЦИЙ	107
ГЛАВА 6 КЛЕТКА КАК СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЕДИНИЦА ОРГАНИЗМА	114
ГЛАВА 7 ОБМЕН ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКЕ И ОРГАНИЗМЕ.....	142

ОСНОВНЫЕ СОБЫТИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА.....	146
ГЛАВА 8 ПУТИ И МЕХАНИЗМЫ УПРАВЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМОМ	159
ГЛАВА 9 НОРМАЛЬНОЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ, АДАПТАЦИЯ И ПОВРЕЖДЕНИЕ КЛЕТКИ	179
ГЛАВА 10 ФОРМЫ ГИБЕЛИ КЛЕТКИ.....	191
ХАРАКТЕРИСТИКА АПОПТОЗА	192
ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКРОЗА	198
РАЗЛИЧИЯ И ОБЩНОСТЬ АПОПТОЗА И НЕКРОЗА.....	199
ГЛАВА 11 ЗАЩИТНЫЕ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ КЛЕТКИ	201
ЗАЩИТНЫЕ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА	201
ЧАСТЬ 2 ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРОГРАММА ОНТОГЕНЕЗА. ОНТОГЕНЕЗ ГЛАВНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ И ЗАЩИТНЫХ СИСТЕМ И ЕГО НАРУШЕНИЯ. ПОКАЗАТЕЛИ ЗДОРОВЬЯ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГРУЗ. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ. ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЫ ГЛАВА 12 ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРОГРАММА ОНТОГЕНЕЗА	223
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ	224
ЭТАПЫ, ПЕРИОДЫ И СТАДИИ ОНТОГЕНЕЗА.....	234
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	246
ГЛАВА 13 ОНТОГЕНЕЗ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО НАРУШЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕРВНОЙ ТКАНИ.....	247
ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРООНТОГЕНЕЗА.....	251
СОЧЕТАННЫЕ ПОРАЖЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СТРУКТУР МОЗГА.....	263
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	266
ГЛАВА 14 ОНТОГЕНЕЗ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО НАРУШЕНИЯ ОБЩИЕ ДАННЫЕ	267
ХАРАКТЕРИСТИКА ОНТОГЕНЕЗА ЭНДОКРИННЫХ ОРГАНОВ И ИХ ГОРМОНОВ	271
ОСНОВНЫЕ ЭНДОКРИНОПАТИИ	279
ВРОЖДЕННЫЙ И ПРИОБРЕТЕННЫЙ ГИПОТЕРИОЗ.....	282
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	290
ГЛАВА 15 ОНТОГЕНЕЗ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО НАРУШЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ.....	291
ОНТОГЕНЕЗ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ.....	294
ИММУННЫЙ ОТВЕТ	297
РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НА АНТИГЕН.....	308
КЛАССИФИКАЦИЯ НАРУШЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ	312
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	313
ГЛАВА 16 ОНТОГЕНЕЗ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО НАРУШЕНИЯ.....	314
ОНТОГЕНЕЗ ОРГАНОВ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ	315

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРИЧИНЫ БЕСПЛОДИЯ	330
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	333
ГЛАВА 17 ЗДОРОВЬЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГРУЗ И НАСЛЕДСТВЕННАЯ ПАТОЛОГИЯ ПОКАЗАТЕЛИ ЗДОРОВЬЯ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГРУЗ ЧЕЛОВЕКА	333
ПРИЗНАКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ.....	335
ГЛАВА 18 МЕТОДЫ ПЕРВОГО ЭТАПА ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ	354
МЕТОДЫ ПЕРВОГО ЭТАПА ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ.....	354
ГЛАВА 19 МЕТОДЫ ВТОРОГО ЭТАПА ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ	368
ПОПУЛЯЦИОННО-СТАТИСТИЧЕСКИЙ МЕТОД	368
МЕТОДЫ ВТОРОГО ЭТАПА ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ	369
СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДНК-ДИАГНОСТИКИ.....	378
ГЛАВА 20 МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ	387
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ	387
МЕТОДЫ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ	391
ЧАСТЬ 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БОЛЕЗНИ С ТРАДИЦИОННЫМ И НЕТРАДИЦИОННЫМ НАСЛЕДОВАНИЕМ. ОТДЕЛЬНЫЕ КЛАССЫ И НОЗОЛОГИИ. ПРОФИЛАКТИКА НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ ГЛАВА 21 МОНОГЕННЫЕ БОЛЕЗНИ	407
ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ	408
ХАРАКТЕРИСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ НОЗОЛОГИЙ МОНОГЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ	415
ГЛАВА 22. МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ И ЗАБОЛЕВАНИЯ ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА.....	429
НАСЛЕДУЕМОСТЬ	432
ОТДЕЛЬНЫЕ НОЗОЛОГИИ БОЛЕЗНЕЙ С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ	436
ГЛАВА 23 ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ И МАЛЫЕ АНОМАЛИИ РАЗВИТИЯ.....	448
ОТДЕЛЬНЫЕ НОЗОЛОГИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ СИНДРОМОВ МНОЖЕСТВЕННЫХ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ	454
ГЛАВА 24 ХРОМОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ	459
ОТДЕЛЬНЫЕ НОЗОЛОГИИ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ХРОМОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ.....	461
ГЛАВА 25 ОНКОГЕННЫЕ БОЛЕЗНИ.....	468
ГЛАВА 26 ПЕРОКСИСОМЫ И МИТОХОНДРИИ И ИХ БОЛЕЗНИ.....	485
ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРОКСИСОМ И ПЕРОКСИСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ	486
ХАРАКТЕРИСТИКА МИТОХОНДРИЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ.....	493
ГЛАВА 27 ЭКСПАНСИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОВТОРОВ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КСИЛОТЫ И БОЛЕЗНИ ЭКСПАНСИИ	500
ФЕНОМЕН ЭКСПАНСИИ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОВТОРОВ И ЕГО ОСОБЕННОСТИ.....	501
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЕЗНЕЙ ЭКСПАНСИИ.....	505

БОЛЕЗНИ ЭКСПАНСИИ КОДИРУЮЩИХ ПОВТОРОВ	508
БОЛЕЗНИ ЭКСПАНСИИ НЕКОДИРУЮЩИХ ПОВТОРОВ	518
ГЛАВА 28 ИМПРИНТИНГ И БОЛЕЗНИ ИМПРИНТИНГА.....	524
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЕЗНЕЙ ИМПРИНТИНГА	525
ОТДЕЛЬНЫЕ НОЗОЛОГИИ	529
ГЛАВА 29 ПРИОННЫЕ БЕЛКИ И ПРИОННЫЕ БОЛЕЗНИ	537
ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ.....	539
ОТДЕЛЬНЫЕ НОЗОЛОГИИ	541
ГЛАВА 30 ПРОФИЛАКТИКА НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ.....	546
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	558
ПРИЛОЖЕНИЯ	559
ПРИЛОЖЕНИЕ I	559
ПРИЛОЖЕНИЕ II	566
ОРГАНИЗАЦИЯ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ В РОССИИ.....	566
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ.....	567
Глава 1	567
Глава 2	568
Глава 3	568
Глава 4	568
Глава 5	569
Глава 8	569
Глава 9	570
Глава 10	570
Глава 11	570
Глава 12	571
Глава 13	571
Глава 14	572
Глава 15	572
Глава 16	572
Глава 17	573
Глава 18	573
Глава 19	574
Глава 20	574
Глава 21	575
Глава 22	575

Глава 23	576
Глава 24	576
Глава 25	576
Глава 26	577
Глава 27	577
Глава 28	578
Глава 29	578
Глава 30	578
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	580

БЛАГОДАРНОСТЬ СОТРУДНИКАМ НАУЧНЫХ И ПЕДАГОГИЧЕСКИХ КОЛЛЕКТИВОВ, КОЛЛЕГАМ ПО РАБОТЕ И РЕЦЕНЗЕНТАМ

Автор признателен сотрудникам научных и педагогических коллективов, работы которых, а также подрисуночные и подтабличные примечания и подписи, были процитированы в данном учебном пособии.

Особую благодарность автор выражает сотрудникам кафедры медицинской генетики педиатрического факультета ГОУ ВПО РГМУ: профессорам С.С. Жилиной, В.В. Шахтарину, аспиранту кафедры Д.В. Мартыновскому за помощь в подготовке учебного пособия.

Автор благодарит рецензентов учебного пособия: академика РАМН профессора В.Н. Ярыгина и члена-корреспондента РАМН профессора А.А. Терентьева за высказанные ценные замечания.

Заведующий кафедрой медицинской генетики ГОУ ВПО РГМУ, д.м.н., профессор Г.Р. Мутовин

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА

В современной молекулярной медицине (ее фундаментальную часть составляют генетика и биохимия - собственно геномика и протеомика) широко используются данные и методы молекулярной генетики, биохимии, а также биоинформатики. Без знания этих наук любой врач независимо от его специальности не может состояться как профессионал высокой квалификации.

Одна из главных задач молекулярной медицины - исследование структуры и функционирования наследственного материала, формирующего (при тесном взаимодействии с факторами окружающей среды) физико-химические, генетические, биохимические, морфологические, физиологические, иммунологические, интеллектуальные, психические, психологические, физические и другие особенности (характеристики) многоклеточного организма человека.

От сохранения стабильности структуры и функционирования наследственного материала, получаемого каждым новым поколением людей от предшествующих поколений, в первую очередь зависит телесное (соматическое), душевное (психическое), репродуктивное, а следовательно, геномное и протеомное здоровье человека.

Только на такой основе следует рассматривать влияние на каждого отдельного индивидуума следующих факторов: качества и количества потребляемых им продуктов питания, питьевой воды; условий и образа жизни; состояния окружающей внешней среды.

Безусловно, для оздоровления как конкретных лиц, так и населения в целом, большое значение имеют внимание, уделяемое проблеме в семьях, ответственное отношение к себе самого человека, забота руководителей и правительств разных государств об улучшении условий существования граждан, в том числе о повышении уровня развития здравоохранения.

Заведующий кафедрой медицинской генетики педиатрического факультета ГОУ ВПО РГМУ, профессор Г.Р. Мутовин

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ - артериальная гипертензия

АГС - адреногенитальный синдром

АГТ - аланинглиокилат-аминотрансфераза

АДА - аденозиндезаминаза

АДФ - аденозиндифосфат

АИБ - аутоиммунная болезнь

АЛБ - аллергическая болезнь

АТБ - атопическая болезнь

АТР или АТФ - аденозинтрифосфат

АТФ-аза - аденозинтрифосфатаза

АФК - активные формы кислорода

АФП - альфа-фетопротеин

БА - бронхиальная астма

БАР - большая аномалия развития

БГН - болезнь генетической нестабильности

БГП - болезнь геномной памяти

БИ - болезнь импринтинга

БН - болезнь накопления

БНП - болезнь с наследственной предрасположенностью БЭ - болезнь экспансии ВБ - врожденная болезнь ВГ - врожденный гипотиреоз

ВГКН - врожденная гиперплазия коры надпочечников

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ВПР - врожденный порок развития

ГАГ - гликозаминогликаны

ГКГ - главный комплекс гистосовместимости

ГЛЖС - гипертрофия левого желудочка сердца

ГП - геномный (генетический) полиморфизм

ГФА - гиперфенилаланинемия

ГХ - газовая хроматография

гяРНК - гетерогенная ядерная РНК ДАГ - диацилглицерин ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота ДНФГ - динитрофенилгидразин ДЦП - детский

церебральный паралич ЗВУР - задержка внутриутробного развития ИВБ - инфекционная (вирусная) болезнь ИДБ - иммунодефицитная болезнь

ИПСД - информационно-поисковые системы диагностики

иРНК - информационная РНК

КЛ - кардиолипид

ЛБ - лизосомная болезнь

ЛПБ - лимфопролиферативная болезнь

ЛПВП - липопротеины высокой плотности

ЛПНП - липопротеины низкой плотности

ЛТС - лимфоидная ткань слизистых

МАР - малая аномалия развития

МАРК - митогенактивирующая протеинкиназа

МБ - моногенная болезнь

МВ - муковисцидоз

МГК - медико-генетическое консультирование МД - миотоническая дистрофия

МИСС - мультимедийная информационно-справочная система

МЛ - муколипидозы

МПС - мукополисахаридозы

мРНК - мессенджер РНК

МС-ПЦР - метилспецифическая ПЦР

МТБ - митохондриальная болезнь

мтДНК - митохондриальная ДНК

МФЗ - мультифакториальное заболевание

мяРНК - малые ядерные РНК

мяРНП - малые ядерные рибонуклеопротеины

н.п. - нуклеотидная пара НБО - наследственная болезнь обмена ННМЗ - наследственные нервно-мышечные заболевания НСмВПр - наследственный синдром множественных ВПр НФБ - недифференцированная форма болезни ОГБ - онкогенная болезнь ОДР - однородительская дисомия ОДЦЖК - очень длинноцепочечные жирные кислоты ОИК - основной инициаторный комплекс ОНС - однонуклеотидный полиморфизм ОСС - окислительно-стрессорный сигналинг ОФМД - окулофарингеальная мышечная дистрофия ПАБ - проангиогенная болезнь ПАРП - поли-АДФ-рибоза-полимераза ПБ - прионная болезнь ПВО - перивентрикулярная область ПД - пренатальная диагностика ПДИ - протеиндисульфид-изомераза ПДРФ - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПерБ - пероксисомная болезнь ПЗ - приобретенное заболевание ПИ - потеря импринтинга
ПК G - протеинкиназа G ПК A - протеинкиназа A

ПНГЗ - первичное нейрогенетическое заболевание ПОЛ - перекисное окисление липидов
ППИ - пептидилпролин-изомеразы ПСК - преждевременный стоп-кодон ПФ -
пиридоксаль-5-фосфат ПЦР - полимеразная цепная реакция РКМВ - рваные красные
мышечные волокна РНК - рибонуклеиновая кислота

рРНК - рибосомные РНК

СА - синдром Ангельмана

СБ - синдром Блума

СБВ - синдром Беквитта-Видемана

СВЦГ - синдром врожденной центральной гиповентиляции

СГК - синдром гормонального криза

СДН - синдром дыхательной недостаточности

СМ - сфингомиелин

СМБ - синдром Мартина-Белл

СОД - супероксиддисмутаза

СПВ - синдром Прадера-Вили

СФЛ - сфинголипидозы

СХО - сестринские хромосомные обмены

СЦ - синдром Цельвегера

СЦА - спиноцеребеллярная атаксия

ТГ - транзиторный гипотиреоз

ТКИД - тяжелый комбинированный иммунодефицит ТКР - Т-клеточные рецепторы тРНК
- транспортная РНК

ТРФР - трансмембранные рецепторы факторов роста

ТСМ - tandemная масс-спектрометрия

ТСХ - тонкослойная хроматография

ТХД - трихотодистрофия

УО - умственная отсталость

ФА - фенилаланин

ФАГ - фенилаланингидроксилаза

ФАГС - ФАГ-стимулирующий белок

ФГ - фосфатидилглицерин

ФИ - фосфатидилинозит

ФК - лизофосфатидная кислота

ФКУ - фенилкетонурия

ФНО - фактор некроза опухолей

ФНП - феноплацентарная недостаточность

ФС - фосфатидилсерин

ФХ - фосфатидилхолин

ФЭ - фосфатидилэтанолламин

ХБ - хромосомная болезнь

ХМС - хроматомасс-спектрометрия

ХС - хромосомный синдром

ЦИ - центр импринтинга

ЦМВ - цитомегаловирус

ЭГ - эссенциальная гипертензия

ЭР - эндоплазматический ретикулум

ЯБДК - язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки

ЯБЖ - язвенная болезнь желудка

ЯБЖиДК - язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки

ЧАСТЬ 1 ВВЕДЕНИЕ В ГЕНОМИКУ И ПРОТЕОМИКУ. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ПОЛОЖЕНИЯ. НАСЛЕДОВАНИЕ ГЕНОВ И ПРИЗНАКОВ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМА. МЕТАБОЛИЗМ И ПУТИ УПРАВЛЕНИЯ. ПОВРЕЖДЕНИЕ И ГИБЕЛЬ КЛЕТКИ. ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ КЛЕТКИ

ГЛАВА 1

ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРЕДМЕТЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕДМЕТА ГЕНЕТИКИ

В современной медицине наступила эпоха признания геномики и протеомики человека. Что они собой представляют? Вспомним старое название предмета - генетика человека, учение о наследственном материале биологического вида «*Homo sapiens*» (Человек разумный) и об изменчивости данного материала в условиях окружающей среды. У истоков генетики человека (это конец XVIII - начало XIX в.) стояла школа «овистов», основанная итальянцем Марчелло Мальпиги, предположившим существование женского яйца, «пробуждающегося после оплодотворения мужской семенной жидкостью». Последователь Мальпиги, француз Мопертюи, выдвинул гипотезу о том, что «родительские семенные жидкости человека смешиваются между собой, прежде чем образуется зародыш, имеющий признаки обоих родителей». Позднее, в 1827 г., австриец Карл Эрнест фон Бэр описал яйцеклетку млекопитающих, положив начало развитию генетики человека.

В настоящее время в рамках генетики человека выделяют клиническую и медицинскую генетику. Это фактически одна и та же наука об организации и функционировании наследственных структур больного человека, его больных и здоровых родственников. Исторически более обоснован термин «клиническая генетика», ибо первая клиническая статья с описанием больного с алкаптонурией была опубликована в 1902 г. английским врачом Арчибальдом Гарродом (1858-1936), тогда как названия «общая генетика», и в частности «медицинская генетика», появились после 1906 г.

По существующим среди врачей-клиницистов представлениям, клиническая генетика характеризуется широким применением синдромологического метода (см. главу 18) и отсутствием применения популяционно-статистического метода (см. главу 19); в медицинской же генетике все наоборот: отсутствие применения синдромологического метода и широкое применение популяционно-статистического метода.

Предмет клинической (медицинской) генетики - генетические причины и механизмы развития наследственных форм патологии, роль генетических факторов в формировании ненаследственных форм патологии, а также способы диагностики, профилактики и лечения подобных заболеваний.

С тех пор как в конце XX в. генетиками было сформулировано понятие «геном» (см. главу 2), генетику как науку стали именовать геномикой. В результате ее развития в 1995 г. появилось еще одно новое название - протеомика. Современное определение клинической геномики и протеомики можно сформулировать так: учение о молекулярной структуре и функционировании генетического материала, контролирующего происхождение, развитие, воспроизводство и наследование индивидуальных особенностей организма, проявляющихся на доклиническом и клиническом уровнях у больного человека, его больных и здоровых родственников.

ИСТОРИЯ И ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ ГЕНЕТИКИ

Основоположник генетики - австро-венгерский естествоиспытатель Грегор Иоганн Мендель (1822-1884). В молодые годы он преподавал физику и естествознание в общеобразовательной школе, впоследствии стал послушником, а затем настоятелем

Брюнненского монастыря ордена Святого Августина, расположенного в небольшом городке Брюнна в Австро-Венгрии (ныне город Брно в Чехии). В 1865 г. Г. Мендель опубликовал в трудах провинциального общества естествоиспытателей природы статью «Опыты над растительными гибридами», в которой на примере скрещивания различных линий садового гороха выделил закономерности наследования признаков. Однако эта работа долгое время оставалась неизвестной большинству современников Г. Менделя. Только в 1900 г. ботаники из разных стран - Хуго де Фриз (1848-1935) из Голландии, Карл Корренс (1864- 1933) из Германии и Эрих фон Чермак (1871-1962) из Австрии - на других биологических объектах, независимо друг от друга и почти одновременно «переоткрыли» закономерности наследования, установленные Г. Менделем.

Теперь 1900 г. считается официальным (но не фактическим) годом рождения генетики как науки, хотя сам термин «генетика» предложен только в 1906 г. англичанином Уильямом Бэтсоном (ученый перепроверил эксперименты Г. Менделя и полностью подтвердил их огромное значение).

Начало XX в. примечательно для историков генетики еще рядом событий. В 1901 г. немецкий врач Карл Ландштейнер разделил кровь человека по антигенам на 4 группы: 0, А, В и АВ, т.е. впервые привел пример наследования признаков у человека. Позже К. Ландштейнер совместно с П. Левиным и О. Винером описали Rh-фактор и группы крови системы MN (1927).

В дальнейшем в биологии и медицине произошли грандиозные перемены, связанные с возникновением и последующим торжеством идей эволюционизма, представлений о законах наследственности. Уже к 1950 г. не одни лишь прогрессивно мыслящие люди, но даже самые непримиримые ортодоксы, священники Римской католической церкви, были вынуждены согласиться с правомочностью эволюционной теории: ее признал в специальной энциклике «Происхождение человека» Папа Римский Пий XII. Однако католики настаивали: «Душа человека создана Богом!»

Следует отметить: материалистический термин «эволюция» впервые применил в начале XX в. английский врач Френсис Гальтон (1822-1911), основоположник евгеники - науки о совершенствовании человеческого рода.

Известно, что Ф. Гальтон приходился кузеном гораздо более знаменитому англичанину - Чарльзу Дарвину (1809-1882). Но тот отдавал предпочтение теории «пангенезиса», основанной еще до н.э. древними философами Гиппократом (460-557), Платоном (429-347) и Аристотелем (384-322). Именно увлечение «пангенезисом» помешало Ч. Дарвину полностью обосновать (до рождения генетики) собственную прогрессивную теорию. Его ошибку в дальнейшем исправили последователи ученого.

Согласно современным представлениям, эволюция есть процесс происхождения биологических видов или прогрессивного развития живой материи, обусловленный внутренними (мутации) и внешними (естественный отбор, изоляция, дрейф генов) факторами.

Следует отметить: в конце XX в. дарвиновская интерпретация эволюции и даже правомерность самой постановки вопроса о том, была ли эволюция на Земле, ставились под сомнение деятелями церкви и поддерживающими их учеными-профессионалами. В частности, в противовес эволюционизму (эволюционизм — современный дарвинизм как синтетическая теория эволюции) они выдвинули концепцию креационизма, предлагая рассматривать многообразие органического мира как результат божественного творения. Сторонники креационизма основываются на сравнении положений дарвиновской теории эволюции с данными биологических дисциплин (включая молекулярную биологию) и

утверждают: теория эволюции - лишь одно из возможных объяснений существования органического мира, не имеющее фактического обоснования, а потому сходное с религиозными системами взглядов. По мнению таких исследователей, «наступает закат эпохи дарвинизма».

Существует также еще одна точка зрения на происхождение жизни на Земле: «...возможно, что это длительный эксперимент внеземных цивилизаций» на людях и других земных биологических видах, доставленных сюда из космоса в качестве «подопытных кроликов» много тысяч (если не миллионов) лет назад.

В пользу последней гипотезы свидетельствует, например, библейская легенда о Всемирном потопе: достаточно вспомнить «пассажиров» Ноева ковчега. Однако хотелось бы знать: куда столь странный, аморальный, по земным меркам, «эксперимент» заведет наш органический мир? Оставим данный вопрос без ответа и продолжим рассмотрение истории развития генетики, весьма неоднозначного в нашей стране.

В России о зарождении генетики как науки впервые сообщил в 1912 г. на лекции в Петербургском университете Николай Иванович Вавилов (1887-1943) - великий русский генетик, положивший начало пониманию эволюции мутационного процесса, создавший учение о генетических основах селекции, сформулировавший закон гомологичных рядов в наследственной изменчивости. Именно по инициативе Н.И. Вавилова в 1929 г. было принято решение об организации кафедр генетики и селекции в университетах СССР.

Большой вклад в мировую и отечественную генетику внес Николай Константинович Кольцов (1872-1940), в 1928 г. - заведующий кафедрой биологии во 2-м Московском университете (в дальнейшем - 2-й Московский медицинский институт им. Н.И. Пирогова, а затем - Российский медицинский университет). Работы Н.К. Кольцова (по изучению групп крови, активности фермента каталазы, проблем мутационной изменчивости; химического мутагенеза, трансплантации органов и тканей; их сохранения в высушенном состоянии, методов омоложения организма и культивирования клеток *in vitro*) стали поистине новаторскими. Но главное его достижение - обоснование положения о наследственных молекулах - хромосомах, пророчески предугаданный принцип самоудвоения наследственных молекул (1927).

Правда, Н.К. Кольцов считал носителем наследственной информации не молекулу ДНК, а молекулу белка (в дальнейшем оказалось, что белок есть функция или проявление гена). Только в 1953 г. Джеймс Уотсон, Френсис Крик, Морис Уилкинс и Розалинда Франклин в своих работах доказали обратное, впервые описав молекулярную структуру нативной ДНК и получив ее рентгенограмму в виде двойной спирали («нечто вроде штопора»). В 1962 г. за это открытие трое из авторов получили Нобелевскую премию (Р. Франклин тогда уже скончалась от рака).

Предположение Н.К. Кольцова о наличии хромосом сыграло огромную роль в развитии генетики. Следует отметить, что биологическую функцию молекулы ДНК связали с ее химическим строением раньше 1953 г. Еще в 1944 г. О.Т. Эйвери и его коллеги установили: ДНК является носителем генетической информации.

Н.К. Кольцов был также близок к представлению, высказанному в 1941 г. Джорджем Бидлом и Эдвардом Тэйтемом в виде формулы: «один ген - один фермент». В дальнейшем она трансформировалась в формулу «один ген - один признак», а затем «один ген - одна полипептидная цепь». Последняя длительное время считалась основной в молекулярной биологии, но в конце XX в. появились и другие: «два гена или семь генов - одна полипептидная цепь; один ген или отдельные участки гена - несколько полипептидных

цепей». Тем не менее, несомненно: Н.К. Кольцов, бесспорно, стоял у истоков молекулярной биологии и медицины.

Отечественную классическую школу исследований морфологии хромосом человека основал Григорий Андреевич Левитский (1878- 1942). Он заложил фундамент цитогенетики, создал первое руководство по материальным основам наследственности (1924). В его дискуссиях с С.Г. Навашиным и Л.Н. Делоне в 1931 г. впервые используются термины «кариотип» (хромосомный набор вида со всеми особенностями: числом, формой и деталями строения хромосом) и «идиограмма» (схематическое изображение хромосом).

Один из классиков русской генетики - Сергей Сергеевич Четвериков (1870-1959). Его работа «О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики» (1926) положила начало целому научному направлению - популяционной генетике, в которой как наиболее важные факторы, оказывающие влияние на формирование генетической структуры популяции, рассматриваются естественный отбор и изоляция.

Впервые термин «популяция» введен В. Иогансеном в 1903 г. для обозначения неоднородной в генетическом отношении группы особей одного биологического вида и их отличия от особей однородной (чистой) линии. Однако еще Чарльз Дарвин объяснял происхождение видов в ходе эволюции в том числе наследственной изменчивостью и конкуренцией в пределах совокупности особей, т.е. популяции.

Многие работы русского генетика Александра Сергеевича Серебровского (1892-1948), опубликованные в 1920-е годы, для своего времени уникальны. Он занимался строением гена, его дробимостью и эволюцией, генетикой и селекцией отдельных видов животных, генетикой популяций, геногеографией, антропогенетикой и закономерностями органической эволюции, генетическими методами борьбы с вредными насекомыми. А.С. Серебровский был первым заведующим кафедрой генетики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Нельзя не отметить заслуги многих других выдающихся советских и русских генетиков. Среди них Борис Львович Астауров (1904-1974) - первый президент Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова. Работы Б.Л. Астаурова посвящены исследованиям роли ядра и цитоплазмы в наследственности и онтогенезе, экспериментальной эмбриологии, биологии развития, искусственному партеногенезу и андрогенезу.

Широко известны труды Николая Петровича Дубинина (1907- 1998) - многолетнего лидера советской генетики, организатора и директора Новосибирского института цитологии и генетики и Московского института общей генетики АН СССР, академика АН СССР, почетного члена многих иностранных академий и научных обществ. К числу исследованных им проблем относятся: сложная структура гена, эффект положения, теория мутаций, проблемы генетики популяций, радиационной и экологической генетики и генетики человека.

Среди наиболее известных имен отечественных генетиков - имя Юрия Александровича Филиппченко (1882-1930), читавшего первый в России курс лекций по генетике в Петербургском университете (1913), изучавшего генетику пшеницы, эмбриологию и сравнительную анатомию низших насекомых, а также наследственность у человека.

Как сказано в начале главы, год рождения клинической генетики - 1902, когда Арчибальд Гаррод впервые опубликовал сообщение о наследственном заболевании - алкаптонурии. В 1908 г. в другой своей статье под названием «Врожденные нарушения метаболизма» он

объединил четыре наследственных заболевания (алкаптонурия, альбинизм, пентозурия и цистинурия).

Основоположник отечественной клинической генетики - Сергей Николаевич Давиденков (1880-1961), первый русский врач-генетик и выдающийся детский врач-невропатолог. В круг его научных интересов входили: наследственные болезни нервной системы и их медикогенетическое консультирование, причины клинического полиморфизма наследственных болезней, эволюционно-генетические проблемы в невропатологии. С.Н. Давиденков обосновал необходимость применения в медицине генеалогического анализа, сформулировал принцип генетической гетерогенности и показал клиническую (фенотипическую) неоднородность многих нозологических форм (штрюмпелевская параплегия, семейные атаксии, амиотрофии). Он ввел в неврологию точные методы генетики, объяснил клинический полиморфизм неврологических заболеваний как результат сходного проявления разных мутаций и разной выраженности действия патологического гена (в зависимости от генотипической среды), предложил первую классификацию наследственных болезней нервной системы, основанную на генетических закономерностях.

Неоценимый вклад в развитие отечественной медицинской и клинической генетики внесли А.П. Акифьев (1938-2007), Л.О. Бадалян (1929-1994), А.Ф. Захаров (1928-1986), С.Г. Левит (1894- 1937), М.Е. Лобашев, А.А. Прокофьева-Бельговская (1903-1984), Н.В. Тимофеев-Рессовский (1900-1981) и др. Их заслуги - внедрение достижений генетики в медицину, распространение и приумножение генетических знаний даже в тридцатилетний период гонений на советскую генетику (1930-1960). В частности, в 1930 г. в Москве был организован Медико-биологический институт, переименованный в 1932 г. в Медико-генетический институт (директор - С.Г. Левит), где до 1937 г. успешно работал центр близнецовых исследований, большое внимание уделялось изучению мультифакториальных заболеваний. Однако затем институт закрыли, его директора и многих сотрудников репрессировали.

Только в 1969 г. в Москве вновь создается Институт медицинской генетики, преобразованный в 1990 г. в Медико-генетический научный центр АМН СССР, а затем РАМН.

Возрождение клинической генетики в России началось в конце 1970-х гг. во 2-м Московском медицинском институте им. Н.И. Пирогова (ныне Российский государственный медицинский университет), на кафедре нервных болезней педиатрического факультета (возглавляемой тогда Леоном Оганесовичем Бадаляном). Именно здесь впервые стали читать лекции по клинической генетике для студентов.

ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТКИ И РАЗВИТИЯ ЦИТОГЕНЕТИКИ

Отдельного рассмотрения заслуживает история изучения клетки и самостоятельного направления генетики - цитогенетики или науки об организации и функционировании хромосом.

Исследования клеточной организации живых организмов начались в 1665 г., когда Роберт Гук с помощью первого микроскопа, сделанного Левенгуком, обнаружил в тонком срезе пробки мелкие структуры, названные им клетками. И только в 1839 г. (через 174 года) ботаник Маттиас Якоб Шлейден и зоолог Теодор Шванн высказали гипотезу об универсальности клеточного строения живых организмов.

В конце XIX в. благодаря работам Луи Пастера и Рудольфа Вирхова ученые пришли к выводу: все организмы первоначально развиваются из одной-единственной клетки-

прародителя. Она делится на две дочерние клетки, каждая из которых снова делится на две дочерние клетки, и так продолжается до окончательного формирования многоклеточного организма. В дальнейшем некоторые клетки становятся специализированными и никогда не делятся, другие клетки постепенно отмирают, им на смену приходят новые клетки.

В XX в. окончательно установили: клетка - основная биологическая единица многоклеточного организма, окруженная тонкой плазматической мембраной, отделяющей внутреннюю среду клетки от внешней среды.

Плазматическая мембрана удерживает вместе все внутриклеточные компоненты (органеллы), каждый из которых окружен собственной мембраной. Через плазматическую мембрану в клетку поступают или выводятся из нее различные химические соединения.

Самой заметной органеллой клетки является ядро, содержащее хромосомы (ядерная ДНК).

Первое упоминание о хромосомах относится к 1880 г., когда В. Флемминг при исследовании клеток роговицы глаза человека обнаружил от 22 до 28 хроматиновых тел. Сам термин «хромосома» впервые введен В. Вальдейером в 1888 г.

К концу XIX в. были более или менее подробно изучены механизмы клеточного деления - митоз и мейоз. Э. Страсбургер, занимаясь растениями, а В. Флемминг - животными, установили наиболее важное свойство митотических и мейотических делений - упорядоченную редукцию наследственного материала. В 1902 г. Теодор Бовери (1862-1915) предположил: наследственные факторы («факторы Менделя») расположены в хромосомах, и именно хромосомы - носители наследственной информации в клетке. Таким образом Т. Бовери заложил основы хромосомной теории наследственности.

В дальнейшем хромосомную теорию наследственности окончательно сформулировали Томас Хент Морган (1866-1945) и его ученики: К. Бриджес, Г. Мёллер и А. Стертевант, получившие за это Нобелевскую премию.

С тех пор исследования хромосом и их генетический анализ проводились в тесной взаимосвязи, но в основном касались насекомых и растений. Так, в 1913 г. К. Бриджес описал случай аномального распределения хромосом в мейозе у дрозофилы, названного им «нерасхождением».

В середине 1930 годов благодаря исследованиям Г. Мёллера (также на дрозофиле) выяснились закономерности мутационного процесса; на их основе сформулировали концепцию генетического груза.

Однако в отличие от цитогенетики насекомых и растений, исследования хромосом человека развивались медленно; длительное время ученые даже не представляли, какое число хромосом свойственно людям.

Парадоксальный факт: «Человек сначала узнал строение ядра атома и только потом - число хромосом в ядрах собственного тела». Так сказал американский генетик Т. Хаушке.

Бурное развитие цитогенетики человека началось в 1956 г., когда Д. Тио и А. Леван, а позднее С. Форд и Д. Хамертон установили в культуре фибробластов легочной ткани эмбрионов человека истинное число хромосом, оказавшееся равным 46 (для сравнения: у макаки-резус - 42 хромосомы, у шимпанзе - 48).

С тех пор нормальным кариотипом у человека считается 46, XX (женщина) и 46, XY (мужчина). Это двойной (диплоидный) набор хромосом соматической клетки.

Именно пол оказался первым признаком, наследование которого напрямую связано с поведением хромосом в мейозе (образование гамет).

Известно, что в соматических клетках женщины и мужчины содержится по 22 пары аутосом (хромосомы тела) и одна пара гоносом (половые хромосомы). У женщин гоносомы представлены двумя гомологичными (одинаковыми) X-хромосомами, так как в ходе оогенеза образуется один тип яйцеклеток, содержащих только X-хромосому. У мужчин гоносомы представлены одной X-хромосомой и одной Y-хромосомой, так как при сперматогенезе образуются 2 типа сперматозоидов: либо с X-хромосомой, либо с Y-хромосомой (их соотношение примерно 1:1).

Генетическое определение пола происходит в момент оплодотворения яйцеклетки сперматозоидом и целиком зависит от типа последнего: сперматозоид с X-хромосомой обуславливает формирование женского организма, с Y-хромосомой - мужского.

Важные даты в истории цитогенетики - 1959 и 1960 гг. Именно тогда она стала наиболее популярным направлением развития генетики человека. Произошло следующее.

Во-первых, в 1959 г. Ж. Лежен, Р. Тюрпен и М. Готье обнаружили у детей с болезнью Дауна лишнюю хромосому 21 (как думали тогда). Фактически это была хромосома 22, которую впоследствии стали считать хромосомой 21.

Во-вторых, в 1959 г. С. Форд и сотрудники, а также Р. Джекобс и Ж. Стронг описали три заболевания, вызванных нарушением числа половых хромосом: синдромы Тернера, Клайнфельтера и трипло-Х.

В результате двух таких открытий возник вопрос о необходимости создания номенклатуры (классификации) хромосом.

В-третьих, в 1960 г. для исследования хромосом ученые предложили три методических приема: культивирование клеток, их обработка гипотоническим раствором и использование (для остановки клеточного деления) алкалоида - колхицина.

В-четвертых, в 1960 г. Р. Мурхед нашел способ получения метафазных пластинок из лимфоцитов периферической крови, культивируемых в присутствии фитогемагглютинаина, в дальнейшем ставший основой стандартного метода анализа метафазных хромосом.

Однако возникновение идеи использования лейкоцитов периферической крови *in vitro* и ее первое воплощение датируются 1930-ми годами и связаны с именем отечественного цитолога Г.К. Хрущева.

В-пятых, в 1960 г. К. Патау, Ж. Эдвардс и соавторы описали трисомию по хромосомам 13 и 18, а Р. Ноуэлл и Д. Хангерфорд - «филадельфийскую» хромосому при хроническом миелолейкозе.

В итоге в 1960 г. в городе Денвере (США) состоялась международная научная конференция цитогенетиков, где представили первую номенклатуру хромосом человека в зависимости от их морфологической характеристики, с учетом размеров, формы и положения центромеры.

Согласно денверской номенклатуре, все аутосомы человека имели порядковые номера и делились на 7 групп: А (1-3 пары) - большие метацентрические, В (4, 5) - большие субметацентрические, С (6-12) - средние субметацентрические, D (13-15) - большие акроцентрические, Е (16-18) - малые субметацентрические, G (21, 22) - малые акроцентрические. Внутри групп пары хромосом практически не различались по величине

(при окраске применявшимися тогда методами). По принципу морфологического подобия X-хромосома не отличима от хромосом группы C, а Y-хромосома - от хромосом группы G.

О размерах хромосом стали судить с учетом их абсолютной и относительной длины. Во втором случае размер выражали в процентах, определяемых по отношению к суммарной длине всех хромосом женщины, т.е. гаплоидного (одинарного) набора ее хромосом. Самые крупные хромосомы оказались в 4-5 раз длиннее самых мелких хромосом человека.

Для измерения длины хромосомы был предложен центромерный индекс - доля длины короткого плеча к длине всей хромосомы, принятой за 100%. Например, если центромерный индекс равен 50%, то это метацентрическая хромосома, если меньше 50% - субметацентрическая хромосома, а если центромера расположена близко к концу хромосомы - это аacroцентрическая хромосома.

Концевая часть хромосомы стала называться теломерой. В дальнейшем в теломере находили повторяющиеся последовательности ДНК или теломерную ДНК, препятствующую укорачиванию хромосомы при репликации.

В настоящее время о размерах хромосом судят по содержанию ДНК: количеству нуклеотидных пар (н.п.). Так, самая маленькая хромосома 21 имеет около 50 млн н.п., а самая большая хромосома 1 содержит 250 млн н.п. Следует отметить: в дальнейшем денверская классификация хромосом претерпела ряд изменений, внесенных на других научных форумах цитогенетиков (Лондонская конференция, 1963; Чикагский III конгресс, 1966).

В последующие годы с помощью стандартного метода идентификации хромосом были описаны синдром «кошачьего крика», связанный с делецией короткого плеча хромосомы 5 (Ж. Лежен и соавт., 1963), хромосомная нестабильность при анемии Фанкони (Т. Шрёдер и соавт., 1964) и синдроме Блума (Ж. Джерман и соавт., 1965).

Тем не менее, проблема исследования хромосом с помощью стандартного цитогенетического метода решалась медленно. С одной стороны, обнаруживались больные, у которых клинические признаки сочетались с нормальным кариотипом, что заставляло ученых думать о наличии мелких (не выявляемых) структурных изменений хромосом. С другой стороны, выявлялись варианты нормального набора хромосом, не соответствующего фенотипическому полу индивида, или случаи женского кариотипа у мужчин и мужского кариотипа у женщин.

Возможности точной идентификации хромосом появились только в 1968-1970 гг., когда три группы ученых из разных стран - Т. Касперсон и соавторы (Швеция), Б. Датриллзукс и Ж. Лежен (Франция), А.Ф. Захаров и Н.А. Егорова (СССР) - предложили основные методы дифференциального окрашивания хромосом человека (G - гимза, Q - акрихин, R - revers-обратный и C - конститутивный гетерохроматин), а также метод дифференциального окрашивания хроматид с помощью бромдезоксимуридина (БДУ), аналога тимина.

Эти методы позволяют идентифицировать различные типы сегментов (блоки) хромосом, а методом дифференциального окрашивания хроматид выявляют сестринские хроматидные обмены (СХО).

Как оказалось, обнаруживаемое при дифференциальном окрашивании хромосом чередование сегментов (темная и светлая полосы) характеризуется постоянством, что позволило ученым на состоявшейся в 1971 г. в Париже международной научной

конференции предложить идиограмму гаплоидного набора хромосом человека (см. главу 2).

Парижская номенклатура хромосом предназначалась для описания по единой форме линейной структуры каждой хромосомы. Причем сохранялась прежняя (денверская) нумерация хромосом. Отдельная хромосома стала рассматриваться как непрерывная совокупность сегментов независимо от их окраски (межсегментов в хромосоме нет). Первоначально идентифицировали около 320 сегментов.

Плечи хромосом обозначили латинскими буквами: p - короткое и q - длинное. Каждое плечо разделили на районы, ограниченные регулярно наблюдаемыми четкими морфологическими маркерами. Районы тоже разделили - на сегменты или участки, четко отличающиеся от соседних по интенсивности окраски.

Районы и сегменты пронумеровали арабскими цифрами отдельно для каждого плеча в направлении от центромеры к теломере. Например, запись 5 p13 означает: короткое плечо хромосомы 5, район 1, сегмент 3.

Из методов дифференциального окрашивания хромосом наибольшее распространение получило G-окрашивание. Такое положение сохранялось в цитогенетике до конца 1970-х годов.

В начале 1980-х годов широкое распространение получили более совершенные методы дифференциального окрашивания, позволяющие анализировать мало компактизованные хромосомы на стадиях профазы и прометафазы - соответственно профазные и прометафазные методы. С их помощью удалось разделить нормальный гаплоидный набор хромосом человека на более чем 2000 структурных элементов (сегментов).

Однако механизмы выявления сегментов хромосом даже сейчас еще до конца не ясны. В то же время обнаружены свойства сегментов, отражающие картину эволюции структуры хромосом человека.

В настоящее время цитогенетики разных стран в своей работе опираются на данные последней Международной номенклатуры хромосом (ISCN 2005. A System of Human Cytogenetic Nomenclature / Eds L.G. Shaffer, N. Tommerup. - Basel: Karger, 2004. - 130 p.).

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ТЕОРИИ ГЕНА

История развития теории гена также заслуживает отдельного рассмотрения, так как понятие «ген» многократно изменялось и уточнялось в ходе развития генетики.

О существовании в половых клетках наследственных факторов как дискретных единиц догадывались еще во времена Г. Менделя. Впервые назвал эти факторы генами В. Иогансен в 1903 г.

Дальнейшие представления о гене возникали в связи с формированием хромосомной теории наследственности и других научных воззрений. Существенную роль в развитии теории гена сыграли:

- концепция «один ген - один фермент» (Бидл Дж. и Тейтем Э., 1941);
- доказательство связи биологической функции с химическим строением молекулы ДНК и ее характеристика как носителя наследственной информации (Эйвери О. и соавт., 1944);

- открытие двойной спирали ДНК (Уотсон Дж., Крик Ф. и Уилкинс М., 1953);
- постановка проблемы гена и рассмотрение возможных вариантов генетического кода (Даунс А. и Гамов Г., 1952-1954);
- установление параметров генетического кода для белков (Крик Ф. и Бреннер С., 1961);
- расшифровка генетического кода (Ниренберг М. и Маттеи Дж., 1961; Очоа С., 1962; Корана Х., 1965).

Следует отметить: по мере проникновения в молекулярную структуру наследственного материала все труднее становилось находить в молекулах ДНК границы генов. Это было связано с трудностями локализации нуклеотидов, выделением участков последовательностей ДНК с неизвестными функциями, мигрирующих последовательностей (мобильных генетических элементов), псевдогенов и т.д.

Тем не менее, такие новые сведения не только не изменили имеющихся представлений о тонком строении гена, а напротив, существенно их расширили (см. главу 2).

Современное состояние и перспективы развития геномики и протеомики

Современный этап развития генетики характеризуется огромными достижениями: генетика человека, медицинская и клиническая генетика значительно продвинулись вперед, особенно за последние 20-30 лет.

На основе консолидированных усилий ученых развитых стран мира (США, Англия, Франция, Германия, Швеция, Израиль и Япония), предложивших, профинансировавших и полностью реализовавших международную программу «Геном человека» (1988- 2005), в данной области знаний произошли кардинальные изменения. Результаты выполнения программы трудно переоценить. Она привела к возникновению новых научных направлений - биоинформатики (ее предмет - генетическое разнообразие человека), функциональной геномики (протеомики), экогенетики, а также изучения об этических, правовых и социальных аспектах исследований генома человека.

Теперь указанные дисциплины (особенно вторая и третья) играют важную роль во всех сферах человеческой деятельности. Уже допустимо говорить о быстро нарастающей биоинформатизации и генетизации человечества.

Кратко рассмотрим историю биоинформатики (ранее называемой кибернетикой). Она также незаслуженно пострадала от гонений в советские годы. В настоящее время в рамках биоинформатики разрабатываются и применяются программные алгоритмы для систематизации и анализа данных о структуре и функциях макро- и микромолекул клетки. Полученные сведения затем используются в клинической геномике и протеомике, в том числе для создания новых лекарственных препаратов.

Теперь остановимся на истории протеомики, являющейся одной из основных тем настоящего учебного пособия.

Как сказано в начале главы, рождение протеомики как самостоятельной науки произошло в 1995 г. (официальная дата), хотя биохимики уже почти двести лет изучают белки человека и животных.

Геномика (старое название - генетика) и протеомика объединены одной целью: выяснении характера связей информационных структур - генов - с реально функционирующими

молекулярными машинами (белками), т.е. связей между генами и признаками, генотипом (геномом) и фенотипом (феномом) организма на разных этапах онтогенеза.

Иными словами, современная протеомика (или функциональная геномика) есть следствие (продолжение) развития геномики - от создания генетических (хромосомных) карт до разработки белковых (протеомных) карт. Следовательно, прогресс генетики человека связан с формированием сначала двух направлений, затем с выделением из них новых (дочерних) направлений, а уже из них (в недалеком будущем) - следующих. Именно в этом заключается огромное эволюционное значение генетики человека (как науки о жизни), обуславливающее ее бессмертие.

Тестирование макромолекул генов, белков и других компонентов клеточной структуры, а также расшифровка характера молекулярных связей между генами и белками, между уникальными или повторяющимися последовательностями ДНК, белковыми и небелковыми структурами клетки - главные задачи геномики и протеомики.

В медицине результаты тестирования генов и белков и расшифровки связей между ними используются для диагностики, лечения и профилактики генетических и негенетических заболеваний.

Как известно, в рамках программы «Геном человека» получены данные об организационной структуре и функционировании молекулы ДНК, определена совокупность генов организма (генотип), проведено секвенирование всех последовательностей генома, изучены тонкая структура гена и особенности генной экспрессии, составлены карты всех хромосом, на которых локализованы сотни ранее неизвестных генов, расшифрован геном митохондрий.

Накоплен огромный багаж новых научных сведений, требующих глубокого рассмотрения и анализа. Среди них:

- доказательства необходимости пересмотра существующих взглядов на происхождение современного человека (его генотип содержит следы экспансии более древних генов из Африки, сотни генов получены от бактерий и беспозвоночных, а почти половина генов произошла из мобильных элементов - транспозонов);
- картирование на хромосомах человека свыше 11 000 генов;
- данные о появлении и усовершенствовании новых типов генов: нейрональных генов, генов свертывания крови, генов приобретенного иммунного ответа, генов общих возможностей человека (гены внутриклеточных и межклеточных сигналов, гены индивидуального развития, гены программированной клеточной гибели и контроля транскрипции и др.);
- выделение 5 классов повторяющихся последовательностей ДНК и доказательство их роли в эволюции, процессах естественного отбора и мутагенеза; показано, что повторы могут перестраивать геном, модифицировать и перетасовывать существующие гены, в том числе модулируя в них содержание ГЦ-пар (соответственно Г - гуанин, Ц - цитозин) оснований;
- идентификация генов транспортной РНК и сотен псевдогенов, способствующих реализации функций генов «домашнего хозяйства»;
- обнаружение в геноме огромного числа однонуклеотидных полиморфизмов и коротких фрагментов ДНК; предполагается, что среди них могут быть картированы гены, ответственные за наследование мультифакториальных признаков и заболеваний;

- выделение в кодирующих областях генома CpG-островков (динуклеотидов), связанных с 5'-концами генов; часть из них содержится в рибосомальных генах и псевдогенах;
- открытие новых биологических феноменов (геномная память или маркирование моноаллельной экспрессии импринтированных генов - эпигеномное воздействие на экспрессию); данные о прионных белках как о носителях информации нового типа, хранимой в механизме конформации; данные об экспансии (или росте числа) кодирующих и некодирующих нуклеотидных повторов, связанных с динамической мутацией и антиципацией;
- новая оценка роли многочисленных семейств белков, особенно белков-доменов, которые считаются консервативной частью генома в эволюции.

Показано, что у человека в сравнении с другими биологическими видами в расчете на один белок доменов выявлено больше, и наблюдаются новые их комбинации.

Следует отметить: из всех предполагаемых у человека белков (их примерно 350-400 тыс.) в настоящее время идентифицировано всего 7-8%. Определение и изучение функционирования многих типов белков (белковых комплексов) еще только начинается.

Медицинское значение результатов программы «Геном человека» заключается в следующем.

Главный итог ее реализации - появление и бурное развитие молекулярной медицины, общепризнанными достижениями которой стали:

- доказательство уникальности наследственного материала индивида и проведение на этой основе молекулярно-генетических и биохимических исследований по индивидуальной геномике, протеомике и фармакогеномике;
- выяснение молекулярной природы сотен генных и полигенных болезней (были идентифицированы, клонированы и изучены 320 генов, ответственных за наиболее частые, болезни 170 генов - за редкие; в целом количество моногенных болезней с известной локализацией поврежденного гена уже превышает 1500);
- разработка точных и высокоэффективных методов диагностики (в том числе дородовой, пренатальной) наследственных болезней на разных этапах онтогенеза человека;
- разработка экспериментальных и клинических методов генотерапии, основанной на введении в клетки и последующей экспрессии в них нормальных генов вместо патологических; генотерапия предложена для лечения семейной гиперхолестеринемии, недостаточности аденозиндезаминазы, болезней Альцгеймера и Паркинсона, миодистрофии Дюшенна-Беккера, бешенства, многих форм рака и других заболеваний;
- разработка и усовершенствование методов профилактической (превентивной) медицины, в том числе массового и селективного скрининга наследственных болезней, подходов к созданию геномного (и протеомного) паспорта человека, пресимптоматической дородовой диагностики и др.;
- выяснение роли генетических факторов в этиологии и патогенезе бактериальных и вирусных инфекционных заболеваний, иммунных, онкологических и других болезней;

- доказательство возможности картирования генов, контролирующих формирование и изменчивость отдельных признаков (например, определено влияние изменений структуры отдельных генов на развитие и вариабельность симптомов заболевания; так, различие по

одному основанию в гене рецептора хемокина (CCR5) ассоциируется с чувствительностью к вирусу иммунодефицита (HIV) и способствует формированию синдрома иммунодефицита).

В ближайшие годы основу молекулярной медицины должны составить:

- идентификация сотен и тысяч новых структурных и регуляторных генов;
- выяснение вклада сперматогенеза и оогенеза в развитие мутационного процесса (в первом случае вклад вдвое выше, чем во втором);
- широкое применение методов биоинформатики, включающих:
 - а) тестирование генов, предположительно ответственных за наследственные болезни, с помощью компьютерной базы данных о секвенсе ДНК и последующего скрининга генома человека на различные мутации на основе имеющейся информации о структуре гена;
 - б) тестирование генных сетей или функционально связанных между собой генов, в том числе главных генов и генов-модификаторов ряда нормальных и патологических процессов (выделены генные сети: иммунного ответа - 2190 генов, состоящих из 166 млн нуклеотидов, 6% всех генов; бронхолегочной системы - около 2000 генов; репликации и контроля клеточного цикла - более 400 генов; обеспечения и контроля эритропоэза - 200 генов и др.);
 - в) получение индивидуальных лекарств на основе компьютерной базы данных о клетках-мишенях для таких лекарств (идентифицированы 483 клетки-мишени);
- выявление паралогов генов наследственных болезней (найлены 286 паралогов для 971 гена наследственных заболеваний, включенных в международный каталог OMIM);
- определение предрасположенности к моногенным и полигенным болезням, в том числе тестирование генов внешней среды (контролируют метаболизм, деградацию и детоксикацию ксенобиотиков), генов-триггеров (контролируют ключевые биохимические реакции и механизмы адаптации и деградации естественных метаболитов, включая аминокислоты) и генов-рецепторов (кодируют структуру и функции мембранных белков и поступление в клетку веществ);
- секвенирование участков генома, ответственных за отдельные биологические функции (например, тестирование генов рецепторов, связывающих С-белок);
- разработка новых и совершенствование имеющихся методов генотерапии генных и мультифакториальных болезней;
- разработка правовых и этических требований к созданию и внедрению в медицинскую практику молекулярного (геномного и протеомного) паспорта индивида.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАСШИФРОВКИ ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК

Известно, что генетический код - это условная запись наследственной информации в молекулах ДНК и РНК с помощью кодирующих единиц: триплетов или кодонов.

Как сказано выше, приоритеты в расшифровке генетического кода принадлежат М. Ниренбергу и Дж. Маттеи (1961), С. Очоа (1962) и Х. Корана (1965).

Из их работ, касающихся свойств генетического кода, следует, что эволюционное значение имеют 64 классических триплета, кодирующих 20 основных аминокислот, из

которых (как из отдельных «кирпичиков») формируются структурные белки или «строительные материалы» основного структурного сооружения многоклеточного организма - клетки, а также ее функциональные элементы на основе белков (ферменты) и другие (дополнительные) структурные элементы как связанные, так и не связанные с белками (см. главу 2).

Все 64 кодона сформированы либо из одного и того же, либо из двух одинаковых (или разных), либо из трех одинаковых (или разных) азотистых оснований.

С учетом имеющихся данных постараемся расширить наши представления о структуре и свойствах кодирующих единиц и в первую очередь попытаемся определить теоретически возможное количество кодонов, которые можно составить из всех сочетаний четырех азотистых оснований, входящих в состав молекул ДНК и РНК. Результат получается такой: число кодирующих единиц, составленное из одного и того же основания, равно 4, из двух оснований - 16, трех оснований - 64, четырех оснований - 256.

Очевидно, если третье значение включает в себя 64 классических кодона, то четвертая величина больше всего соответствуют общему объему теоретически возможных комбинаций, составленных из разных сочетаний четырех азотистых оснований. Если предположить, что кодон будет включать больше четырех оснований, например пентаплет (четыре разных + одно повторяющееся основание) или секстаплет (четыре разных + два повторяющихся основания) и т.п., то возможных комбинаций будет гораздо больше.

Иными словами, возникает вопрос, не кодируют ли последовательности нуклеотидов, не входящие в число классических кодирующих единиц, другие структурные и функциональные компоненты клетки, включая:

- молекулы аминокислот, не относящиеся к классу основных аминокислот;
- молекулы моносахаридов и полисахаридов;
- молекулы фосфолипидов, сфинголипидов, жирных кислот, холестерина и других химических соединений.

Подобная гипотеза позволяет предполагать: в ближайшей перспективе вслед за каноническим генетическим кодом ученые, вероятно, расшифруют один или несколько дополнительных генетических кодов, основанных на наличии кодонов, сформированных из других повторяющихся последовательностей нуклеотидов, входящих в состав молекулы ДНК.

В пользу правомочности вышесказанного свидетельствует целый ряд данных, полученных благодаря программе «Геном человека».

- Отличия генетического кода ядерной ДНК от кода мтДНК. Например, метионин в ядерной ДНК кодирует кодон АУГ, а в мтДНК - кодон АУА; аргинин в ядерной ДНК кодируют кодоны АГА и АГГ, тогда как в мтДНК они служат стоп-кодонами (см. главу 2).
- Некодирующие последовательности ДНК или интроны, могут функционировать как кодирующие последовательности - экзоны. *Первый пример* - такое кодирование возможно за счет различных комбинаций интронов и экзонов при альтернативном сплайсинге, в ходе которого с одного гена транскрибируется несколько типов мРНК, как в случае аллельных серий (см. главу 5). *Второй пример* - кодирование рРНК, тРНК и гистоновых белков. *Третий пример* - обнаружены 16 мутаций генов, обусловленных инсерциями интронов: Alu-повторов - 2 мутации, LINE-повторов - 12 мутаций и SINE-повторов - 2 мутации.

- Выполнение интронами функций сигнальных молекул (см. главу 8).
- В интронах иногда находят гены. Так, в интроне гена фактора VIII, контролирующего свертываемость крови, расположен другой ген (ситуация названа «ген в гене»).
- В интронах порой находятся регуляторные участки некоторых генов. Они могут располагаться как в интронах внутри гена, так и в интронах, значительно удаленных от гена (например, гены альфа- и бета-цепей гемоглобина HbA).

Кроме того, в последние годы выделен класс болезней экспансии три-, тетра- и полинуклеотидных повторов, относящихся как к кодирующим, так и к некодирующим нуклеотидным последовательностям ДНК (см. главу 27).

ГЕНОМНОЕ И ПРОТЕОМНОЕ ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА

Грандиозные события в мировой биологической и медицинской науке, произошедшие на рубеже XX и XXI вв. (см. выше), обратили внимание ученых на необходимость пересмотра взглядов на проблемы, связанные со здоровьем человека.

Рассмотрим содержание понятий: здоровье, геномное здоровье и протеомное здоровье.

Согласно обобщенным данным, впервые опубликованным в 1990 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), здоровье человека зависит от ряда факторов: от условий и образа жизни - на 50%, от состояния окружающей среды - на 20-22%; от наследственного материала - на 20%, от уровня здравоохранения - на 8-10%.

Из тех же данных следует: геномное здоровье есть стабильное состояние (организация и функционирование) наследственного материала. Оно обеспечивает постоянство внутренней среды (гомеостаза) организма и ее независимость от колебаний внешней среды, т.е. гомеостаз организма определяется его генотипом.

С геномным здоровьем тесно связано здоровье протеомное, обусловливаемое сохранением стабильности механизмов экспрессии генов и модификации продуцируемых ими белков.

Известно, что практически все болезни человека прослеживаются до изменений, происходящих на уровне протеинов. Протеины становятся причиной болезни, если:

- происходит замена одного базового основания на другое, приводящая, например, при серповидноклеточной анемии к образованию аномального гемоглобина;
- наблюдается неправильный фолдинг (модификация) протеинов после их синтеза или трансляции; например протеины, вызывающие образование тромбов, остаются неактивными до тех пор, пока не претерпевают соответствующих изменений;
- патологический полиморфизм протеинов является следствием генетических вариаций первичной структуры ДНК (генетического полиморфизма), вызывающих повышенную индивидуальную склонность к определенным болезням, проявляющуюся как патологическая трансляция и взаимодействие протеинов.

Следует отметить, что геномное и протеомное здоровье человека как понятия в настоящем учебном пособии рассматриваются впервые. Существует еще целый ряд понятий, связанных с негеномными и непротеомными аспектами здоровья человека и обсуждаемых в многочисленных работах, где только формулировок термина «здоровье человека» насчитывается более 80 (Разумов А.Н. и соавт., 1996).

Геномное и протеомное здоровье базируется на стабильности генотипа и гомеостаза клетки и организма, зависит от действия факторов окружающей среды (совместимых с жизнью), обеспечивается потенциалом главной молекулы жизни - молекулы ДНК, является основой эволюционной стабильности человека как биологического вида, фундаментом его соматического (телесного), психического (душевного) и репродуктивного здоровья.

Таким образом, значение геномного и протеомного здоровья трудно переоценить.

Нарушения геномного и протеомного здоровья формируют генетический груз. Увеличение его объема происходит параллельно с научно-техническим прогрессом. Только за один XX в. оно достигло 8,5-10%, т.е. современный объем генетического груза несопоставим с таковым, накопленным за всю предыдущую историю человечества со времен Гиппократов.

Подтверждение значительного роста объема генетического груза - открытие в последние годы новых классов молекулярных болезней с нетрадиционным наследованием (см. главы 26-28).

В ближайшем будущем большое значение в медицине приобретет протеомика: вероятно, ученые обнаружат огромное количество протеомных болезней. Значит, уже сегодня существует необходимость усиленного внимания к молекулярно-генетическим и биохимическим исследованиям структурных и функциональных нарушений здоровья человека.

Интенсивные молекулярные исследования крайне необходимы для развития валеологии (наука о здоровье здоровых), дисморфологии (тератологии), старых и новых клинических направлений - биохимии, фармакогенетики, иммуногенетики, неврологии и нейрогенетики, нейрофизиологии, онкогенетики, психиатрии и психогенетики, генетики бронхиальной астмы, инсульта, инфаркта и других тяжелых состояний человека.

Очевидно, в основу перспективных научных изысканий должны лечь не только широко применяемые современной молекулярной медициной методы профилактического тестирования патологических генов и генотипов, но и методы профилактического тестирования патологических белков и их комплексов.

Например, в валеологии необходимо широкое тестирование наследственной предрасположенности к различным болезням, физических возможностей организма (выносливость, выживание в экстремальных условиях, спортивное мастерство), интеллектуальных способностей личности (поиск математических, художественных и других талантов), состояния репродуктивной функции, а также прогнозирование продолжительности жизни (в том числе спортивной).

В тератологии (дисморфологии) геномное тестирование уже давно применяется в диагностике хромосомных болезней, больших и малых аномалий развития, генетически детерминированных комплексов множественных врожденных пороков развития, но пока еще нет протеомного тестирования.

В детской психиатрии начинает развиваться тестирование детского аутизма, во взрослой психиатрии - тестирование шизофрении, маниакально-депрессивного психоза и других аффективных состояний.

В иммунологии распространяется тестирование антигенов гистосовместимости трансплантируемых тканей и органов, а также тестирование генов иммунодефицитных состояний.

Следует отметить, что врачи уже сегодня без всяких ограничений могут проводить геномное и протеомное тестирование при условии полного соблюдения ими этических норм и правил (см. главу 20).

Назрела также необходимость разработки методов радикальной терапии геномных и протеомных болезней. Одной из задач протеомики на ближайшее время представляется поиск обходных метаболических путей и реакций в клетке и организме, наверняка имеющих место наряду с основными метаболическими путями при определенных болезнях. Ведь именно через обходные пути, по-видимому, следует направить терапевтическое воздействие синтезированных на основе данных современной биоинформатики новых лекарственных молекул белковой и небелковой природы.

Вероятно, рано или поздно появится и начнет осуществляться новая международная научная программа под названием «Протеом человека». В пользу такого предположения свидетельствует соотношение белков, выделенных (7%) и не выделенных (93%) у человека, т.е. изученных и неизученных.

КОНЦЕПЦИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРОТЕОГЕНОМИКИ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ

Накопленный врачами за всю многовековую историю медицины огромный теоретический и практический опыт позволяет сформулировать концепцию клинической протеогеномики, основанную на принципах «прямой генетики», на стратегии функционального картирования (регистрации), предполагающую путь «от белка к гену» и исключаящую альтернативный путь «от гена к белку», характерный для «обратной генетики». Эта концепция - основа профессиональ-

ной деятельности врача любой специальности - предусматривает 7 действий (шагов), предпринимаемых при осмотре больного.

Шаг первый (или общая клиническая часть) - регистрация у пациента симптома или симптомокомплекса с помощью общих клинических методов (врачебный осмотр, синдромологический и клинико-генеалогический методы; реже - близнецовый метод).

Шаг второй (или протеомная часть) - оценка симптома (симптомокомплекса) как результата молекулярного нарушения трансляции белка (белкового комплекса) с помощью клинико-лабораторных методов (биохимический, иммунологический, морфологический и др.).

Шаг третий (или геномная часть) - определение генетической причины симптома (симптомокомплекса) с помощью молекулярногенетического, цитогенетического, молекулярно-цитогенетического и других методов.

Шаг четвертый (или дифференциально-диагностическая клиническая и геномная часть) - анализ генетической гетерогенности и клинического полиморфизма признаков болезни, их экспрессивности и пенетрантности, эффектов плейотропии и полимерии, генокопирования и фенокопирования, аллельных серий и др.

Шаг пятый (или клиническая терапевтическая часть) - назначение этиологического и патогенетического лечения болезни, а если радикальные методы терапии отсутствуют, то симптоматического лечения.

Шаг шестой (или клиническая уточняющая диагностическая и терапевтическая часть) - наблюдение за течением болезни и внесение необходимых корректив.

Шаг седьмой (или заключительная часть) - профессиональное заключение врача, сообщаемое пациенту или его близким родственникам, о диагнозе и прогнозе болезни.

Молекулярная медицина, в частности клиническая протеогеномика, вступила в эпоху перехода от традиционных врачебных, клинкоинструментальных и клинко-лабораторных методов обследования больных (см. главы 18 и 19) к методам и технологиям, используемым геномикой и протеомикой (см. главу 20).

Однако основной процедурой обследования был, есть и, несомненно, всегда будет врачебный осмотр. Именно врач, а не молекулярный биолог, биохимик, физиолог или другой специалист - главная фигура в молекулярной медицине.

ГЛАВА 2 СТРУКТУРНАЯ ГЕНОМИКА ОРГАНИЗАЦИЯ НАСЛЕДСТВЕННОГО МАТЕРИАЛА

Наследственность (или наследственный материал) - это генетическая информация, заключенная в молекулах ДНК и РНК. Основная часть ДНК (3,1467 млрд н.п.) находится в ядре, минимальная часть ДНК (16,6 тыс. н.п.) - в цитоплазме (митохондриях) клетки.

Выделяют следующие уровни организации наследственного материала:

- молекулярно-генетический (генный или геномный) уровень - нуклеотидные последовательности молекул ДНК и РНК одной клетки;
- цитогенетический (хромосомный или гетерохроматиновый) уровень - нуклеотидные и аминокислотные последовательности хромосом одной клетки;
- популяционный генетический и фенотипический уровень - генотипы (геномы) и фенотипы (феномы) всех организмов одного и того же биологического вида или геномно-протеомный организменный уровень.

В зависимости от перечисленных уровней в первой половине XX в. в генетике выделились научные направления: молекулярная генетика, цитогенетика и популяционная генетика. В дальнейшем первые два направления трансформировались в структурную геномику, продолжением (следствием) которой стала функциональная геномика (протеомика).

Рассмотрение уровней организации наследственного материала у человека целесообразно начать с наиболее знакомого популяционного генетического и фенотипического уровня.

Как сказано в главе 1, термин «популяция» впервые применен в 1903 г. В. Иогансеном. В современной редакции под ним подразумевается совокупность особей (организмов) одного биологического вида, населяющих определенную географическую территорию.

Биологический вид *Homo sapiens* (Человек разумный) на Земле включает почти 6,5 млрд людей, принадлежащих к различным расам, нациям, народам и народностям, составляющим большие и малые популяции или популяционные группы.

К наиболее известным из них относятся представители 400 основных популяционных групп (около 8% общей популяции человека).

Существует еще огромное число этнических групп (этносов), различающихся по языковым диалектам и наречиям. Жители Земли общаются между собой на 2100 различных языках, объединяющих около 5 тыс. диалектов и наречий.

В России традиционно проживали две основные расы (европейская и азиатская), представленные многочисленными национальностями, народами и народностями. В конце

XX в. у нас насчитывалось 164 популяционные группы. В XXI в. их стало еще больше из-за огромного миграционного притока населения в Россию из бывших союзных республик СССР.

Во всех без исключения популяционных группах всегда можно отличить разных людей друг от друга по генотипическим и фенотипическим признакам как в норме, так и при патологии.

Под генотипическими различиями подразумеваются структурные (физические, химические, генетические, биохимические) и функциональные особенности наследственного материала на геномном (молекулы ДНК и РНК) и хромосомном (геномно-протеомном) уровнях, под фенотипическими различиями - внешние и/или внутренние особенности на уровне фенотипа отдельной клетки и целого организма (соответствующие понятия будут рассмотрены ниже).

В случае патологии практически в каждой популяции выделяют характерные для нее болезни (например, еврейские болезни - Вильсона-Коновалова, Леша-Найяна, Тея-Сакса, меледская болезнь или ладонноподошвенный гиперкератоз у населения, проживающего вблизи Средиземного моря, финские болезни - аспарагилглюкозоаминурия, шведский и японский варианты наследственного нефрита и т.д.).

Теперь рассмотрим молекулярно-генетический и хромосомный уровни организации наследственного материала.

СТРОЕНИЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК

Химическое строение молекулы ДНК в виде двойной спирали предугадано Джеймсом Уотсоном, Френсисом Криком и Моррисом Уилкинсом и впервые продемонстрировано на рентгенограмме Розалиндой Франклин в 1953 г. (рис. 1).

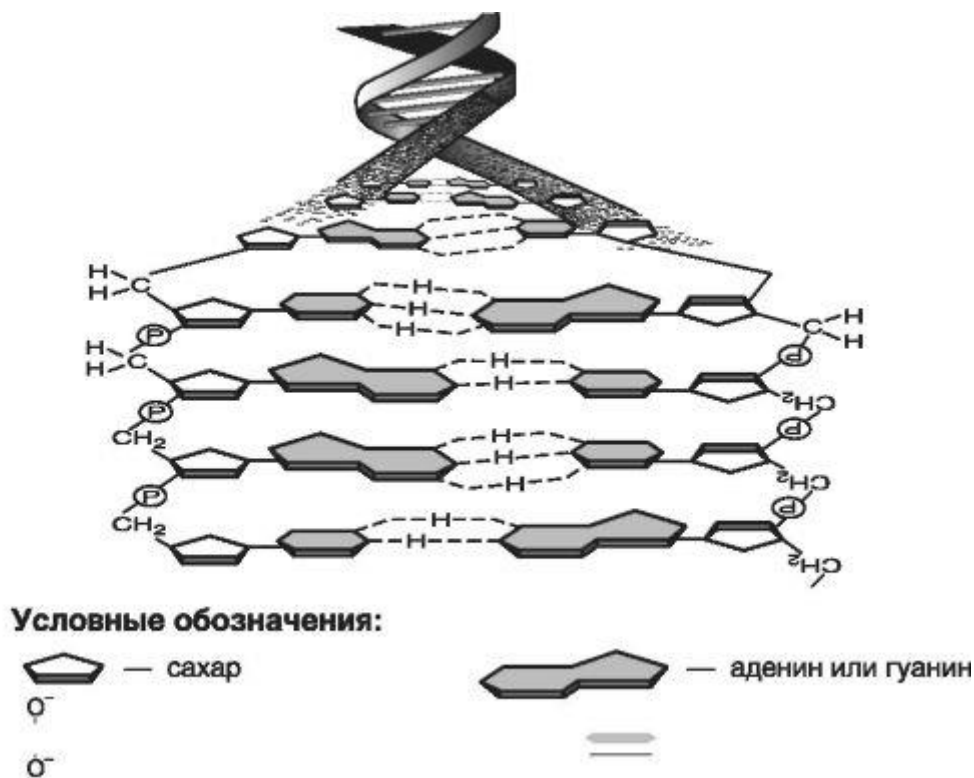


Рис. 1. Схема структуры молекулы ДНК

Как видно из приведенной на рис. 1 схемы, молекула ДНК представляет собой линейный полимер, сформированный из двух полинуклеотидных цепей (нитей) или ДНК-полинуклеотидов, закрученных между собой в правую спираль.

Каждая линейная цепь состоит из нуклеотидов или мономеров, которые можно представить как фосфат (Р) - сахар - основание, т.е. данная последовательность нуклеотидов - первичная структура ДНК.

В ДНК четыре базовых азотистых основания: аденин - А, гуанин - Г, тимин - Т и цитозин - Ц. Из них первые два - пурины, последние два - пиримидины.

Связь нуклеотидов внутри каждой цепи ДНК обеспечивается чередованием фосфатных групп и пятиуглеродного сахара - дезоксирибозы. Между ними существует прочная фосфодиэфирная связь.

Обе линейные цепи закручены в правую спираль таким образом, что внутри спирали расположены основания, а снаружи - сахарофосфатные комплексы. Спираль - вторичная структура ДНК.

Каждая линейная цепь имеет два конца: начало- 5'-конец и 3'-конец.

Связь двух цепей в молекуле ДНК обеспечивается комплементарностью пар оснований. Это означает, что, когда основания А и Т противоположных цепей молекулы расположены друг против друга, между ними спонтанно образуются две слабые водородные связи, тем самым создается АТ-пара (аденин и тимин). В свою очередь, ГЦ-пара (гуанин и цитозин) также представляет собой комплементарную пару, но между гуанином и цитозином возникают три слабые водородные связи.

Спонтанный процесс образования пар оснований (т.е. нуклеотидных пар - н.п.) называется *гибридизацией ДНК*. Другие комбинации пар оснований не комплементарны.

Цепи ДНК между собой антипараллельны (имеют противоположную направленность), т.е. определяющее направление в одной цепи от (5'-конца до 3'-конца) будет противоположно таковому в другой цепи (от 3'-конца до 5'-конца).

Простую полинуклеотидную структуру принято обозначать как последовательность первых букв названий азотистых оснований. Фрагмент двухцепочечной молекулы ДНК с противоположной направленностью цепей изображается так:

5' Ц А Г Т 3' 3' Г Т Ц А 5'

Молекула ДНК - своего рода «винтовая лестница», условные «перила» которой (слева и справа) - сахарофосфатные комплексы, а условные «ступени» - АТ- и ГЦ-пары оснований. Каждая «ступень» состоит как бы из двух половинок: слева - пурин, справа - пиримидин.

Процесс разделения цепей ДНК (или их фрагментов) под действием температуры (около 95 °С) приводит к разрыву водородных связей между комплементарными парами оснований и называется *плавлением ДНК*.

При последующем охлаждении водородные связи между комплементарными парами восстанавливаются. Такая техника гибридизации называется *отжигом ДНК*. Она послужила основой для изучения молекулярной структуры гена.

СТРОЕНИЕ И ТИПЫ МОЛЕКУЛЫ РНК

Молекула РНК образуется на молекуле ДНК в ходе транскрипции (считывание наследственной информации). По структуре, хотя и напоминающей структуру молекулы ДНК, молекула РНК принципиально иная: она представляет собой не две, а одну цепочку, в которой вместо дезоксирибозы содержится рибоза, а вместо тимина - урацил (пиримидиновое основание).

В эукариотических клетках существуют разные типы молекул РНК.

- Рибосомные РНК (рРНК). Существуют в виде 5 субъединиц, образующих рибосомы. Они занимают 80% общего объема разных типов РНК.
- Транспортные РНК (тРНК). Их 20 типов, соответствующих 20 основным аминокислотам. Они участвуют в параллельно протекающих процессах трансляции и биосинтеза и занимают 15% объема.
- Малые ядерные РНК (мяРНК). Это небольшие гетерогенные РНК, участвующие в сплайсинге (см. ниже). Их объем менее 1%.
- Информационные РНК (иРНК), или мессенджер РНК (мРНК). «Мессенджер» означает «посланец» или «голец» (из ядра в цитоплазму).

Иногда используется еще одно название: РНК - транскрипт. Их 2 типа: пре-РНК (копия первичной структуры гена) и мРНК (собственно ген) - это гетерогенные РНК, образующиеся в ходе транскрипции ДНК и занимающие около 5% объема.

МОЛЕКУЛА ДНК - ГЛАВНАЯ МОЛЕКУЛА ЖИЗНИ

Молекулу ДНК характеризуют следующие уникальные свойства.

- Бессмертие и стабильность функционирования. Только молекула ДНК передается из поколения в поколение в стабильном виде. Она обеспечивает непрерывность жизни биологического вида (но не индивида) благодаря сохранению и воспроизводству закодированной в ее структуре наследственной информации о конкретном биологическом виде, обновляющейся в каждом поколении.
- Обеспечение эволюционной преемственности и уникальности наследственной информации в ряду поколений с помощью механизмов взаимодействия между материнским и отцовским (по происхождению) геномами.
- Механизм экспрессии (работы) генов как источник белковых продуктов онтогенеза.
- Наличие восстановительных механизмов (систем репарации) на случай повреждения собственной структуры молекулы.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

Генетический код - условная запись наследственной информации в молекулах ДНК и РНК. В состав белковых молекул (полипептидных цепочек) входят 20 основных аминокислот. Включение в полипептидную цепь одной аминокислоты определяется последовательностью из трех азотистых оснований - триплетом (ДНКили РНК-кодон), кодирующей единицей. Последовательность оснований в одном кодоне имеет принципиальное значение для синтеза аминокислот. Так, если три основания расположены в определенном порядке (тимин, цитозин, аденин), то производится серин, если в другом (аденин, цитозин, тимин), то треонин.

Соответствие ДНКили РНК-кодона той или иной аминокислоте составляет сущность канонического (классического) генетического кода (табл. 1).

Таблица 1. Соответствие ДНКили РНК-кодонов основным аминокислотам

ДНК	Второе основание				
Первое основание	ДНК	А	Г	Т	Ц
	мРНК	У	Ц	А	Г
А	У	УУУ I* УУЦ I* УУА L* УУГ L*	УЦУ S УЦЦ S УЦА S УЦГ S	УАУ Y УАЦ Y УАА Ст УАГ Ст	УГУ С УГЦ С УГА Ст УГГ W*
Г	Ц	ЦУУ L* ЦУЦ I* ЦУА I* ЦУГ L*	ЦЦУ Р ЦЦЦ Р ЦЦА Р ЦЦГ Р	ЦАУ Н* ЦАЦ Н* ЦАА G ЦАГ G	ЦГУ R ЦГЦ R ЦГА R ЦГГ R
Т	А	АУУ I* АУЦ I* АУА I* АУГ М*	АЦУ Т* АЦЦ Т* АЦА Т* АЦГ Т*	ААУ N ААЦ N ААА К* ААГ К	АГУ S АГЦ S АГА R* АГГ R*
Ц	Г	ГУУ V* ГУЦ V* ГУА V* ГУГ V*	ГЦУ А ГЦЦ А ГЦА А ГЦГ А	ГАУ D ГАЦ D ГАА Q ГАГ Q	ГГУ G ГГЦ G ГГА G ГГГ G

Обозначения: Азотистые основания: А - аденин, Г - гуанин, Ц - цитозин, Т - тимин, У - урацил; основные аминокислоты: А - аланин, R - аргинин, N - аспарагин, D - аспарагиновая кислота, V - валин, H - гистидин, G - глицин, Q - глутамин, E - глутаминовая кислота, I - изолейцин, L - лейцин, K - лизин, M - метионин, P - пролин, S - серин, Y - тирозин, T - треонин, W - триптофан, F - фенилаланин, C - цистеин, Ст - стоп-кодон; * - незаменимые аминокислоты, АУГ М - инициаторный кодон.

Как следует из табл. 1, из четырех базовых оснований, входящих в молекулу ДНК или молекулу РНК, можно образовать 64 триплета (ДНК- и РНК-кодоны). Из них три не кодируют основные аминокислоты: УАА, УАГ и УГА - это «стоп-кодоны», прекращающие биосинтез белков в рибосомах. Еще один кодон - ЛУГ - выполняет две функции: кодирует аминокислоту метионин и является инициаторным (индикаторным) кодоном; при контакте с ним РНК-полимераза начинает биосинтез белка в рибосомах.

Оставшиеся триплеты (всего 61) кодируют основные аминокислоты. Причем одну аминокислоту может кодировать как один, так и сразу несколько триплетов - это вырожденный генетический код. Например, только двум аминокислотам соответствуют по одному кодону (метионин - АУГ и триптофан - УГГ); остальным аминокислотам соответствуют 2 кодона и более. Так, у лейцина их 6: УУА, УУГ, ЦУУ, ЦУЦ, ЦУА и ЦУГ.

Свойства генетического кода

Свойства генетического кода:

- триплетность;
- линейность (кодоны в мРНК считываются в направлении 5' -> 3');
- неперекрываемость (каждый нуклеотид в мРНК входит в состав только одного кодона);

- вырожденность (одна аминокислота может кодироваться одним шестью кодонами, различающимися, как правило, по третьему нуклеотиду в триплете);
- универсальность (генетический код универсален для всех видов живых организмов).

Условия функционирования и фундаментальные генетические процессы в клетке

В определенных физиологических условиях (рН среды 7,35; t среды 37 °C) ДНК представляет собой «живой» кодирующий материал, функционирующий только в присутствии специфических ферментов.

Если необходимые параметры отсутствуют, то клеточная ДНК - «мертвый» кодирующий материал, который, однако, можно «оживить», поместив в указанные физиологические условия.

Помимо уже отмеченных выше ДНК- и РНК-полимераз, следует выделить играющие особую роль другие филогенетически устойчивые ферменты клетки - ДНК-хеликазы, способные к разделению двух цепей молекулы ДНК и переводящие ее из нативного состояния в одноцепочечное. Эти ферменты участвуют только в тех генетических процессах, которые непосредственно связаны с разделением родительских цепей молекулы ДНК (репликация, транскрипция, рекомбинация и репарация) или на них основаны. Они называются фундаментальными генетическими процессами клетки. К ним относится также биосинтез белка.

Отдельно рассмотрим каждый из этих процессов.

Репликация ДНК

Репликация ДНК обеспечивает воспроизводство самой молекулы (удвоение) и, следовательно, передачу закодированной в ней информации из поколения в поколение, в том числе измененной информации, если таковая появилась.

В упрощенном виде поясним: в ходе репликации под действием ДНК-полимеразы в молекуле ДНК разрываются слабые водородные связи между АТ- и ГЦ-парами оснований, двойная спираль расходится, и на каждой из разошедшихся цепей (как на матрице) строится комплементарная ей дочерняя цепь. Между матричной и дочерней цепями восстанавливаются водородные связи и формируются АТ- и ГЦ-пары оснований.

Таким образом, в клетке осуществляется комплементарный синтез ДНК, получивший название полуконсервативного способа репликации; он характерен для всех эукариот.

Репликация ДНК начинается в точке инициации, где происходит разъединение двойной спирали и образование одноцепочечных участков ДНК, служащих матрицей для синтеза дочерних цепей. Этот процесс называется вилкой репликации (рис. 2).

Как показано на рис. 2, новая цепь ДНК растет в направлении от 5'-конца к 3'-концу матричной цепи, имеющей противоположное направление (от 3'-конца к 5'-концу).

Первый дезоксирибонуклеотид присоединяется к 3'-концу РНК-праймера (короткий двухцепочечный участок со свободным 3'-концом), выстраивая дочернюю цепочку ДНК.

Поскольку все полимеразы строят цепи только в одном направлении, то синтез ДНК на 3' - 5' родительской цепи будет идти непрерывно - это *лидирующая цепь*, растущая в направлении движения вилки репликации, и для ее продолжения необходим один акт инициации.

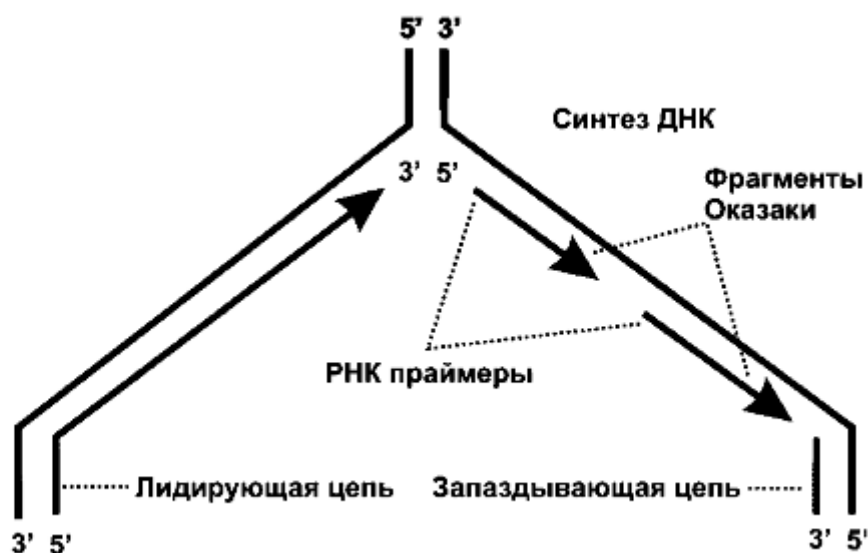


Рис.

2. Схема вилки репликации (по: Гриффите А. и соавт., 2000)

На другой матричной цепи ДНК синтез дочерней цепи осуществляется короткими фрагментами Оказаки - это *запаздывающая (отстающая) цепь*; она растет в направлении, противоположном движению репликативной вилки.

Синтез ДНК прекращается, когда встречаются вилки соседних репликонов. Скорость репликации зависит от количества вилок.

Точность репликации чрезвычайно высока: ошибки происходят с частотой, не превышающей $1:10^{-10}$, и корректируются ДНКполимеразами.

Благодаря полуконсервативному способу репликации обеспечивается удвоение наследственного материала в исходной материнской клетке, после чего она считается подготовленной к последующему делению на две дочерние клетки, в которые поровну распределяется удвоенная молекула ДНК т.е. в каждой из дочерних клеток количество ДНК, соответствует таковому в материнской клетке.

Теоретически возможны еще два механизма репликации: а) консервативный механизм, когда новая молекула состоит из двух новых цепей, а старая молекула - из двух старых цепей ДНК (напоминает механизм однородительской изодисомии - см. главу 28);

б) дисперсный механизм, когда каждая из двух вновь образованных молекул содержит в обеих цепях как новые, так и старые участки молекулы ДНК.

Распределение ДНК по дочерним клеткам обеспечивается в ходе митоза - деление соматической клетки, а также мейоза - деления половой клетки (см. главу 9).

Генетический контроль репликации и контроль клеточного цикла у человека осуществляет генная сеть, включающая более 400 генов, локализованных на хромосомах: 1-4, 6-9, 11, 12, 14, 16, 17, 19, 22 и X-хромосоме.

В некоторых случаях происходит многократная репликация отдельных групп генов, являющаяся одним из важных механизмов регуляции генной активности, позволяющим синтезировать (амплифицировать) огромное число копий генов, которые затем транскрибируются, создавая необходимое количество требуемого генного продукта.

Транскрипция ДНК, процессинг и сплайсинг мРНК

Транскрипция ДНК заключается в считывании или переписывании наследственной информации, закодированной в конкретном участке матричной цепи ДНК, и образовании или синтезе мРНК.

Ключевой фермент РНК-полимераза состоит из трех типов:

- *I тип* находится в ядрышке и отвечает за транскрипцию рРНК;
- *II тип* находится в нуклеоплазме и обеспечивает 20-40% клеточной активности, отвечая за синтез гетерогенной ядерной РНК (гяРНК) - это предшественник мРНК;
- *III тип* находится в нуклеоплазме и отвечает за синтез малых ядерных РНК (мяРНК), тРНК и 5БРНК.

Вместе с тем, многие мяРНК транскрибируются РНК-полимеразой II типа.

В ходе транскрипции РНК-полимераза II «узнает» в молекуле ДНК промотор (место посадки РНК-полимеразы) и присоединяется к нему, а затем, перемещаясь вдоль ДНК, последовательно расплетает двойную спираль.

Начиная с промотора, на матричной цепи ДНК копируется ее зеркальное отражение - дочерняя цепь (или мРНК), по мере продвижения РНК-полимеразы постепенно отходящая от матрицы; двойная спираль ДНК позади фермента восстанавливается.

Когда РНК-полимераза II достигает конца копируемого участка, мРНК полностью отделяется от матрицы. Транскрипция завершается в области терминатора, расположенного в 3'-некодирующей части гена (см. ниже).

Транскрибируемые участки молекулы ДНК способны считываться с образованием активного функционального продукта в виде пре-РНК (будущая мРНК).

Затем образовавшаяся пре-РНК подвергается процессингу (созреванию), в ходе которого из нее вырезаются интроны (некодирующая часть).

Процессинг мРНК включает следующее:

- 1. Происходит метилирование мРНК. На 5'-конце имеется КЭПмодифицированный в 7-м положении метилированный остаток гуанозин-5-трифосфата, соединенный с концевым нуклеозидом способом: 5'-5'. КЭП (определение см. ниже) участвует в регуляции, трансляции и стабилизации мРНК, защищая ее от действия 5'-эндонуклеаз.
- 2. Происходит кэпирование с участием гуанилтрансферазы и метилтрансферазы.
- 3. Происходит полиаденилирование или присоединение, последовательности полиадениловой кислоты к 3'-концу РНК после окончания ее синтеза с участием фермента поли(А)-полимеразы.
- 4. После вырезания интронов оставшиеся в мРНК экзоны (кодирующая часть) соединяются между собой в единую цепочку - это сплайсинг мРНК, или завершающая стадия ее созревания, т.е. заключительное событие процессинга мРНК.

В последние годы установлено: у эукариот за раскручивание цепи ДНК на участке транскрипции и за ее спирализацию после окончания синтеза мРНК, а также отсоединение транскрипта от нити ДНК, отвечают *ДИК-топоизомеразы*, а в процессе сплайсинга мРНК участвуют *рибозимы РИК*, обладающие ферментной активностью.

Эукариотические мРНК стабильны в течение нескольких часов и даже суток.

Таким образом, транскрипция, процессинг и сплайсинг происходят в ядре клетки. Затем мРНК готова к выходу из ядра в цитоплазму и трансляции в рибосомах.

Трансляция информации и биосинтез белка в рибосомах

Молекулы зрелой мРНК в виде гранул выходят из ядра в цитоплазму, где соединяются с рибосомами. Именно в них осуществляется трансляция или передача информации, записанной как последовательность нуклеотидов в мРНК, в последовательность аминокислот в молекулах белков (полипептидных цепочек).

Трансляция информации протекает параллельно с биосинтезом белков. В ее осуществлении принимает участие макромолекулярный комплекс, включающий: мРНК, рРНК, тРНК, амино-тРНК-

синтетазы, белковые факторы инициации, элонгации (удлинение или наращивание полипептида) и терминации трансляции.

Рибосомы - своеобразные «молекулярные машины», представляющие собой цитоплазматические структуры клетки, состоящие из двух неравных субъединиц с разными константами седиментации (60S и 40S) и содержащие все взаимодействующие в ходе трансляции молекулы, что обеспечивает биосинтез белков под контролем мРНК (рис. 3).

На этапе инициации трансляции малая субъединица рибосомы, инициаторная тРНК и фактор инициации «узнают» кодон-инициатор (ЛЮГ) у 5'-конца молекулы мРНК.

Потом «включается» большая субъединица рибосомы, и в ней начинается биосинтез полипептидной цепочки, протекающий в три этапа: присоединение тРНК, образование пептидной связи и продвижение на три нуклеотида. Затем цикл повторяется.

При узнавании кодонов, являющихся стоп-сигналами, белковые факторы терминации транскрипции освобождают полипептидную цепь от рибосомы. Иными словами, биосинтез белка - это управляемая мРНК саморегулирующаяся система клетки.

В биосинтезе белка одновременно участвуют до 100 рибосом. Такой комплекс получил название полирибосомы.

Рекомбинация ДНК

Рекомбинация ДНК - это перегруппировка (перемешивание) генов, поступивших в молекулу ДНК по материнской (50% генов) и отцовской (50% генов) линии. Ее результатом, как правило, становится взаимный (реципрокный) или (редко) односторонний (нереципрокный) перенос участков ДНК с одной молекулы ДНК на другую молекулу ДНК (с несестринской хроматиды одной хромосомы на несестринскую хроматиду другой хромосомы).

Такой механизм обеспечивает эволюционную преемственность и уникальность наследственной информации в ряду поколений (за счет создаваемой гетерогенности), а также играет роль в рекомбинационной репарации ДНК (см. главы 5 и 10).

Репарация ДНК

Репарация ДНК - восстановление структуры молекулы ДНК в случае ее повреждения.

Абсолютной стабильности структуры ДНК не бывает. Это относится как к генам (участкам молекулы ДНК), так и к белкам, в том числе к белкам хромосом.

В соответствии с особенностями гомеостаза (см. ниже), контролируемого генотипом организма, в случае повреждений структуры гена (например, ошибок репликации ДНК) или производимого геном белка (например, ошибок транскрипции мРНК) вслед за дестабилизацией молекулярной структуры должна следовать ее стабилизация. Именно сохранение стабильной молекулярной структуры ДНК обеспечивают восстановительные (репарационные) механизмы, реализуемые с помощью разных ферментных систем клетки (см. главу 10).

Теперь рассмотрим хромосомный уровень организации наследственного материала.

Структурная организация хромосомы

Хромосома есть наследственный материал, организованный в виде хроматинового (гетерохроматинового) или нуклеопротеидного комплекса. Это молекула ДНК, связанная с множеством белковых молекул.

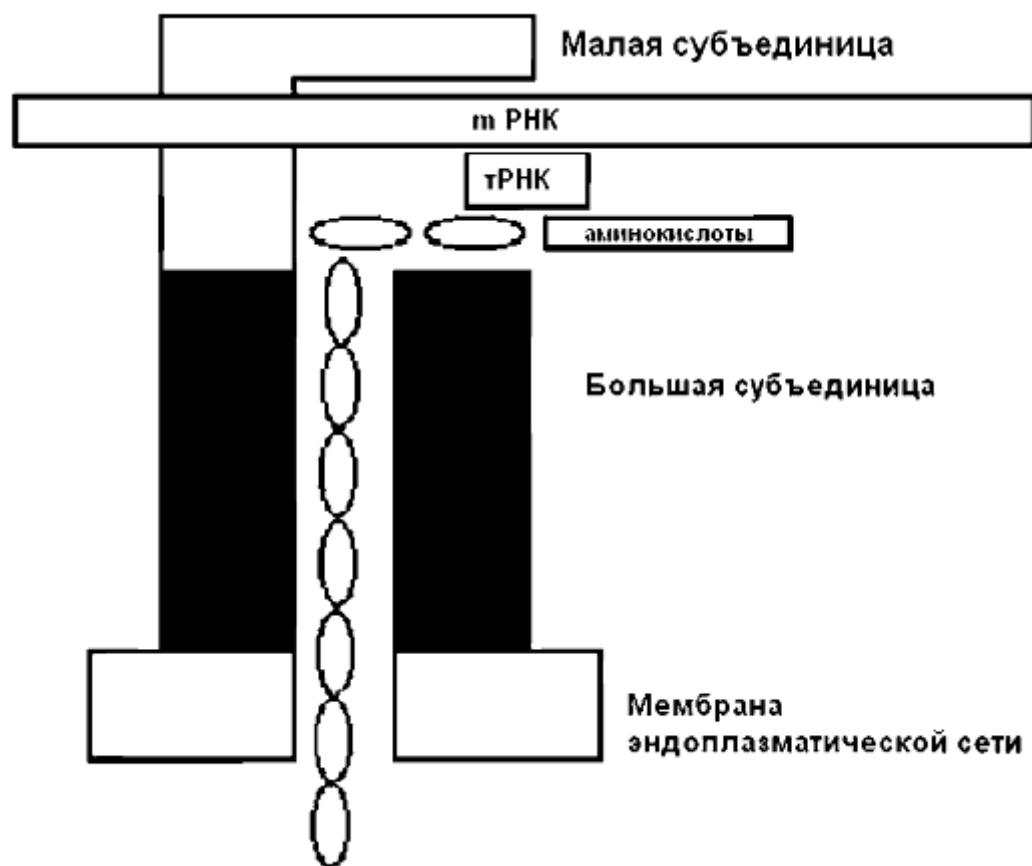


Рис.

3. Схема строения и функционирования рибосомы

Хромосомы, видимые в световом микроскопе в метафазе митоза, - это *метафазные хромосомы*, или компактные хроматиновые структуры.

Прежде чем охарактеризовать морфологию хромосомы, рассмотрим особенности ДНК, которая в метафазной хромосоме находится в наиболее конденсированном состоянии: здесь она плотно упакована для доставки в дочерние клетки и поэтому функционально инертна (неактивна).

Степень конденсации ДНК в хромосоме очень важна, ибо в упакованном состоянии молекула недоступна для действия ферментов и сигнальных молекул.

Если оценить ДНК хромосомы по степени конденсации, то наиболее упакованными будут области центромера, состоящие из повторяющихся последовательностей ДНК (рис. 4).

Как показано на рис. 4, области центромера удерживают две сестринские хроматиды. На внешней поверхности располагаются комплексы белков кинетохора (область вокруг центромера), к волокнам которого прикрепляются микротрубочки митотического веретена.

После деления клетки ее хромосомы становятся менее упакованными и называются *интерфазными хромосомами*.

В отличие от ДНК метафазных хромосом, ДНК интерфазных хромосом функционально активна. Вместе с тем, она обладает еще большей степенью конденсации по сравнению с нитью метафазной ДНК.

На рис. 5 приведено схематическое изображение гаплоидного (одинарного) набора хромосом человека (идиограмма) при их дифференциальном окрашивании. При таком окрашивании участки хромосом различаются по содержанию АТ- и ГЦ-пар оснований. В частности, Q-сегменты или совпадающие с ними G-сегменты соответствуют участкам, богатым АТ-парами, и содержат тканеспецифические гены, реплицирующиеся во второй половине фазы синтеза ДНК (S-период). R-сегменты соответствуют участкам, богатым ГЦ-парами, и содержат общеклеточные гены, или гены «домашнего хозяйства», реплицирующиеся в первой половине S-периода (см. главу 9).

На рис. 6 представлены варианты схематического изображения X-хромосомы человека при дифференциальном окрашивании.

Ядерная ДНК

Согласно результатам исследований, структура ДНК включает следующее.

1. Уникальные последовательности (или экзоны) - кодирующую часть молекулы. Они, как правило, - единичные копии ДНК. Имеют размеры от нескольких сот до двух-трех тыс. н.п. Тысяча пар - одна килобаза (кб), миллион пар - одна мегабаза (мгб).

Экзонами представлено большинство структурных генов. Они локализованы по всему геному (в основном между ALU-повторами) и занимают около 3-5% общего объема.

Не вся кодирующая ДНК представлена одними экзонами.

Во-первых, в диплоидном ядерном геноме каждая такая последовательность уже не уникальна, потому что представлена двумя аллельными копиями, локализованными в идентичных локусах на гомологичных хромосомах отцовского и материнского происхождения. *Во-вторых*, существует множество рассеянных по всему геному неаллельных кодирующих (высокогомологичных) последовательностей ДНК, повторяющихся многократно. Именно они формируют многочисленные семейства генов, объединенных в кластеры (пучки), включающие: гены, гомологичные по коротким мотивам; гены, кодирующие протяженные высококонсервативные домены; псевдогены (поврежденные копии или фрагменты генов); непроцессированные и процессированные гены (как экспрессирующиеся, так и неэкспрессирующиеся).

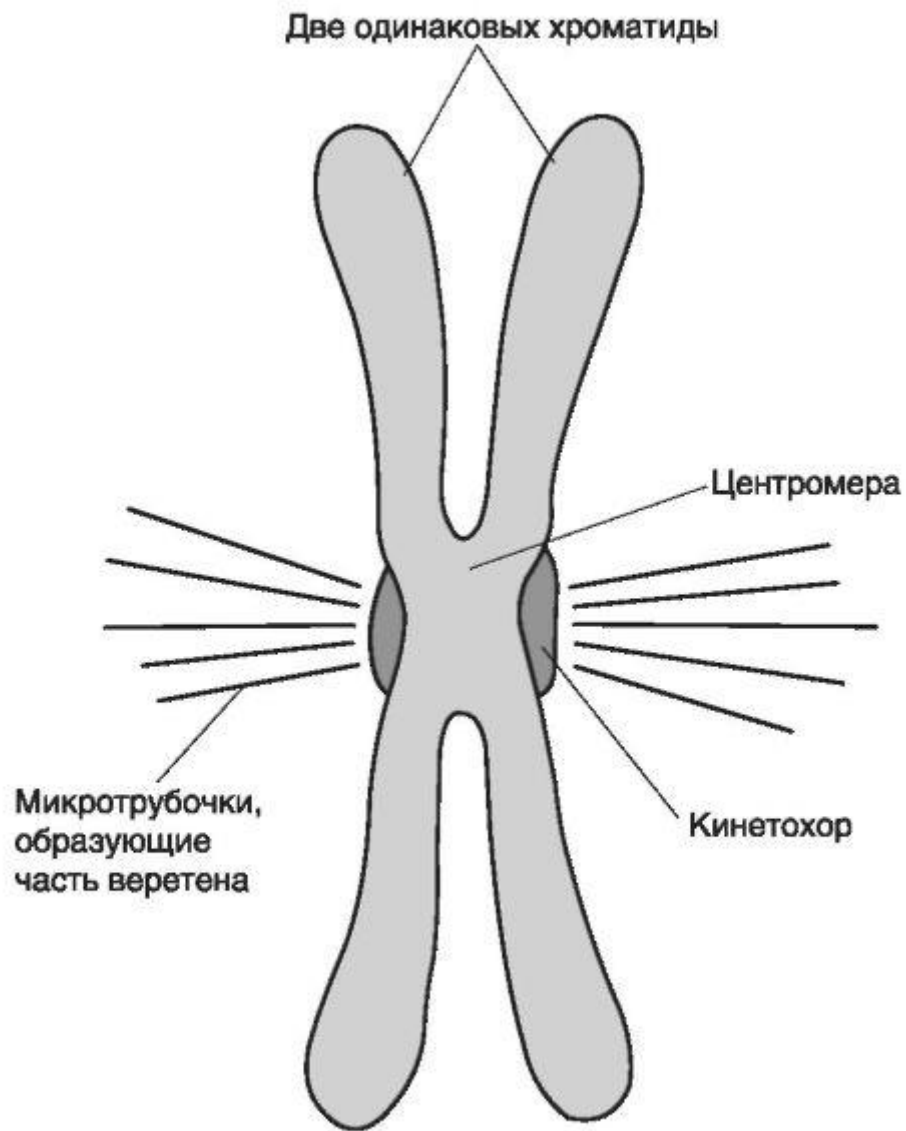


Рис. 4. Морфология хромосомы (по: В. Эллиот, Д. Эллиот, 2002)

2. Повторяющиеся последовательности (или интроны) - не кодирующая часть молекулы. Они могут располагаться как в самих генах, так и между ними. Во втором случае их называют спейсерами или межгенными промежутками.

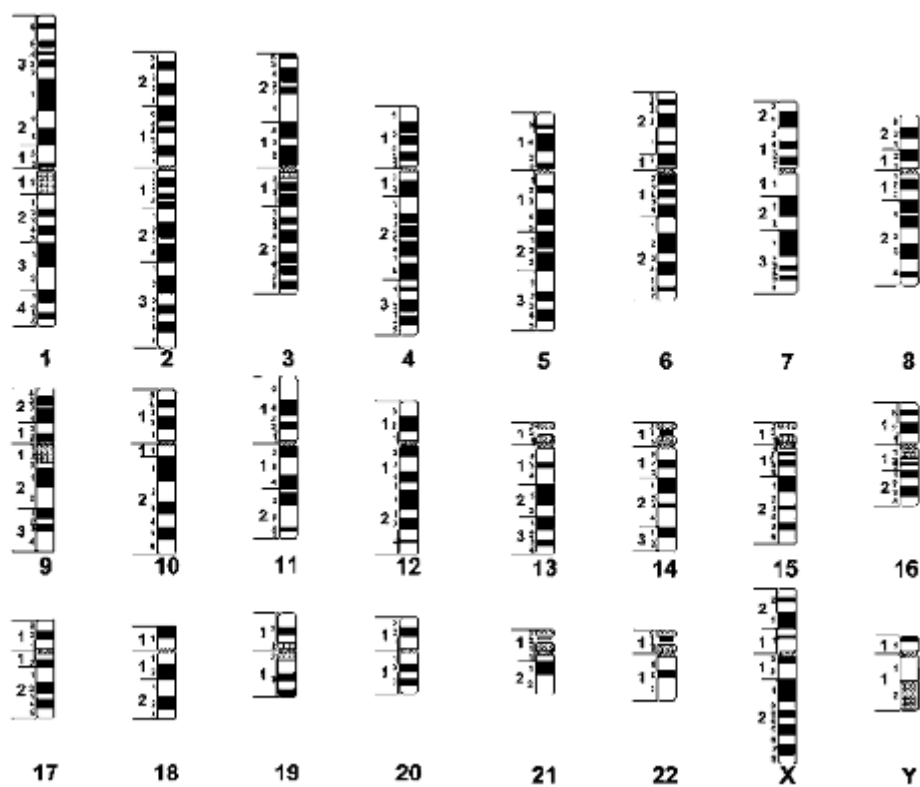


Рис.

5. Схематическое изображение хромосом человека (идиограмма гаплоидного набора):

 участки, окрашиваемые слабо Q- и G-методами и сильно R-методом;

 — участки, окрашиваемые сильно Q- и G-методами и слабо R-методом;

 — основные полиморфные участки хромосом

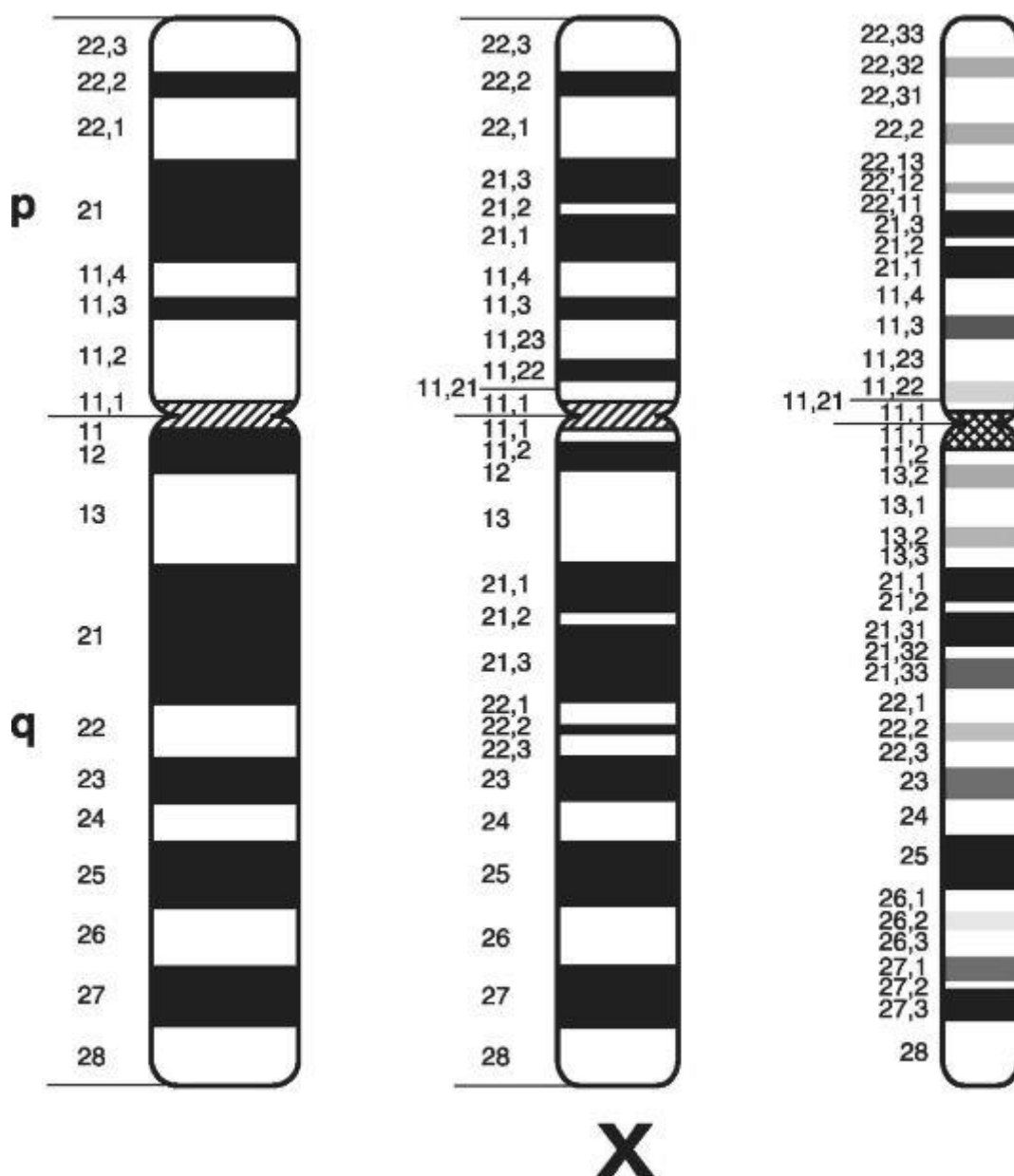


Рис.

6. Варианты схематического изображения X-хромосомы человека: левая часть рисунка - указаны локусы и районы; центральная часть - локусы, районы и сегменты; правая часть - локусы, районы, сегменты и субсегменты;

p - короткое плечо; q - длинное плечо хромосомы

На долю повторяющихся последовательностей ДНК, находящихся внутри генов, приходится 35% общего объема генома. Повторы внутри генов и повторы между генами разделены на длинные (LINE-повторы или L1-элементы), занимающие 20% объема, средние (SINE-повторы или элементы) - 10%, короткие (ALU-повторы или элементы) - 10%, сателлитную ДНК - 15% и другие повторы - 5%.

Размеры (длина) и количество повторов: L1-элементы - свыше 6 кб, их до 100 тыс. копий; SINE-элементы - 0,34-6 кб, их свыше 100 тыс. копий; ALU-элементы - до 0,3 кб, их до 900 тыс. копий.

L1- и ALU-элементы семейства локализованы по всему геному. Например, если хромосому 21 разрезать с помощью рестриктазы на 50 фрагментов (всего в этой хромосоме около 51 млн н.п.), то в большинстве их (но не во всех) обнаружатся как L1-элементы, так и ALU-элементы.

Сателлитная ДНК - это семейство высокоповторяющихся последовательностей (от 5-10 до 170-340 н.п.), локализованных в основном в гетерохроматиновых районах.

Функции повторяющихся последовательностей ДНК остаются пока плохо изученными, хотя уже получен ряд интересных данных (см. главы 1 и 27).

Следует учитывать: структурные и функциональные особенности хромосомной ДНК крайне важны при рассмотрении вопроса об ее преобразованиях в клетке и организме.

Чуть более 50% хромосомной ДНК (22 аутосомы + 1 X-хромосома + 1 «митохондриальная» хромосома) поступает в будущий организм по материнской линии (вместе с яйцеклеткой), а чуть менее 50% (22 аутосомы + 1 Y- или X-хромосома) - по отцовской линии (вместе со сперматозоидом, см. главу 5). В результате оплодотворения в зиготе формируется единый комплекс хромосом (кариотип) и единый комплекс расположенных в них генов (генотип).

Говоря об организации ДНК на хромосомном уровне, следует особо выделить ее уникальность, основанную на гетерогенности (разнообразии) молекулярной структуры. Этот термин был впервые применен С.Н. Давиденковым в конце 30-х годов XX в. для обозначения разнообразия генетических причин наследственных болезней нервной системы, а в дальнейшем стал широко использоваться для других целей, например для обозначения гетерогенности белков (по первичной структуре, аминоконцевой последовательности, белковому пику и другим особенностям).

В случае гетерогенности ДНК имеются в виду уникальные различия между двумя случайно выбранными гомологичными хромосомами любой одной пары или различия по одному нуклеотиду в среднем на каждые 300-500 нуклеотидов (всего в геноме человека 3,165 млрд п.н.). Именно эта особенность лежит в основе метода ДНК-диагностики при идентификации личности человека, а также тестировании генов наследственных болезней. По мнению американских ученых, разрешающая способность метода ДНК-диагностики абсолютна: 99,999999%.

Белки хромосомы

ДНК в составе хромосомы соединена с белками - это нативный хроматин, представленный гистонами (основные или щелочные белки), богатыми аргинином и лизином; гистоны, благодаря своему положительному заряду, образуют ионные связи с отрицательно заряженными фосфатными группами, расположенными на внешней стороне двойной спирали ДНК.

Среди гистонов выделены 5 классов: H1, H2A, H2B, H3 и H4. Гистон H1 вдвое длиннее других и отвечает за целостность нуклеосомной структуры хромосомы: на одну молекулу гистона H1 приходится одна нуклеосома.

Стабилизация нативного хроматина обеспечивается взаимодействием в основном двух гистонов: Н1 и Н3. Причем, не исключено участие в ней еще и негистоновых (кислых) белков; их количество невелико и варьирует.

Негистоновые белки участвуют в образовании длинных петель ДНК, прикрепленных к осевым белковым структурам.

Природа негистоновых белков пока плохо изучена. В их состав входят сложные белки, ферменты, а также регуляторные белки.

Дискретной единицей хромосомы служит нуклеосома - частица размерами около 200 н.п. с диаметром около 10 нм и белковым остовом (гистоновый октамер), включающим по две молекулы каждого из гистонов (кроме Н1) - это хроматин, напоминающий «бусины на нити».

Вокруг белкового остова по его длине накручена *линкерная ДНК* (30-40 н.п.); ее диаметр - 2 нм (рис. 7).

Укладка ДНК на нуклеосомном уровне - *I уровень структурной организации хромосомной нити*.

На *II супернуклеосомном уровне организации* диаметр хромосомной нити (хроматиновой фибриллы) равен 30 нм - это, по-видимому, уровень метафазной хромосомы (модель соленоида). На данном уровне а - нуклеосома; б - нуклеосомы с линкерными участками ДНК; в - нить хроматина 30 нм толщиной; г - петли хроматиновой нити, прикрепленные к центральному поддерживающему белку. Хроматиновая фибрилла состоит из упакованных нуклеосом и ее петли прикреплены к центральному поддерживающему белку.

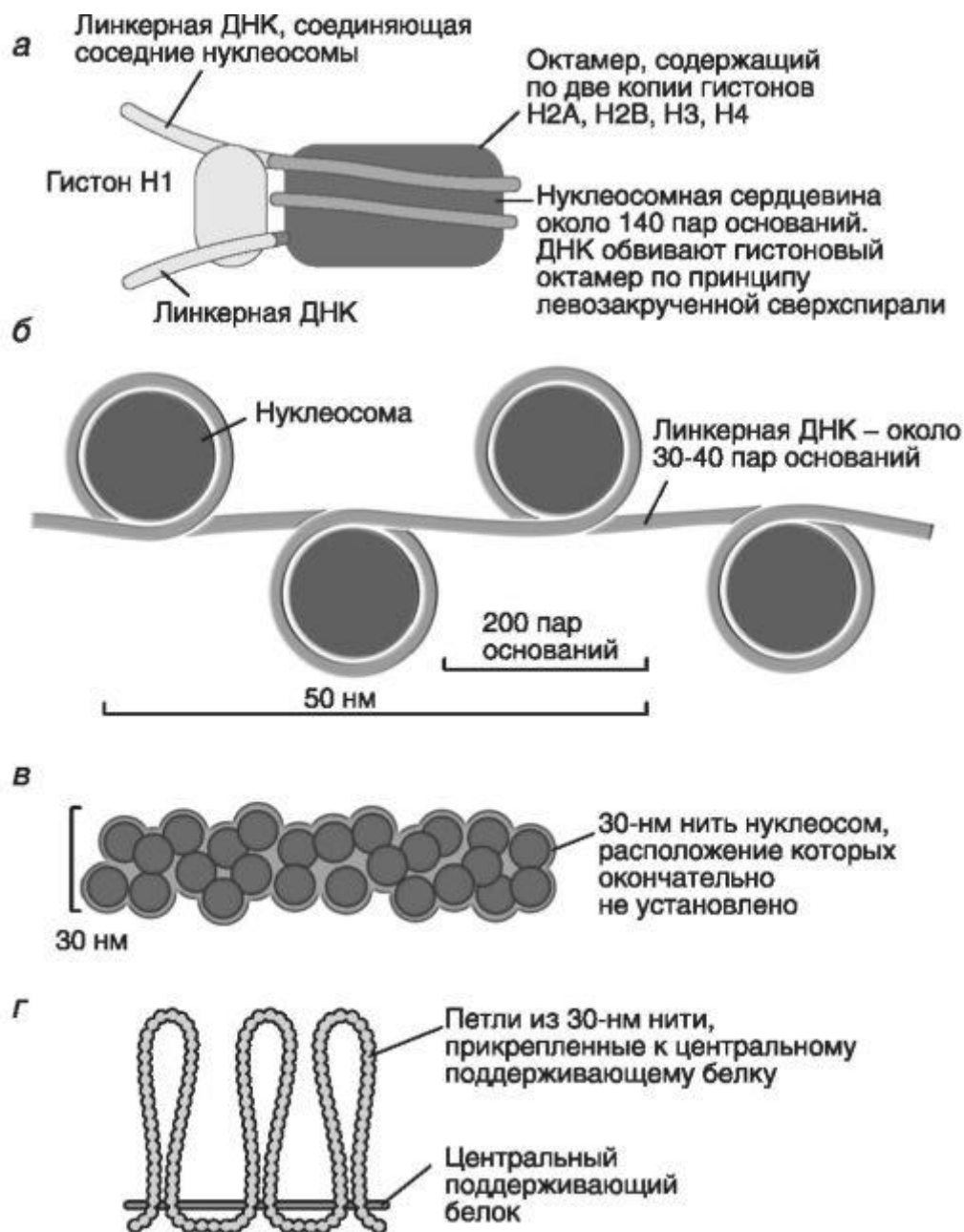


Рис.

7. Компактизация хроматина на нуклеосомном уровне (по Албертс Б. и соавт., 1994):

Предполагается существование еще *III уровня структурной организации хромосомной нити* - вероятно, он должен соответствовать структурам интерфазного ядра, наблюдаемым под световым микроскопом (рис. 8).

Интроны как участки хромосом могут входить или не входить в структуру генов. Как правило, интроны не содержат информацию, необходимую для синтеза белка. В таких участках хромосомная ДНК остается в конденсированном, генетически инертном (неактивном) состоянии - это гетерохроматин. В то же время функционирующие области хромосом (или эухроматин) менее конденсированы и более активны.

Морфологическая неоднородность хромосом определяется изменчивостью конденсации ДНК. В частности, проходя к началу митоза полный цикл конденсации, одни районы интерфазных хромосом деконденсируются в эухроматин, а другие районы остаются в конденсированном состоянии (гетерохроматиновом) в течение всего митотического цикла.

В метафазной хромосоме такое подразделение на эухроматин и гетерохроматин сохраняется, и гетерохроматин наиболее интенсивно выявляется в виде не полностью конденсированных участков (или *вторичных перетяжек*).

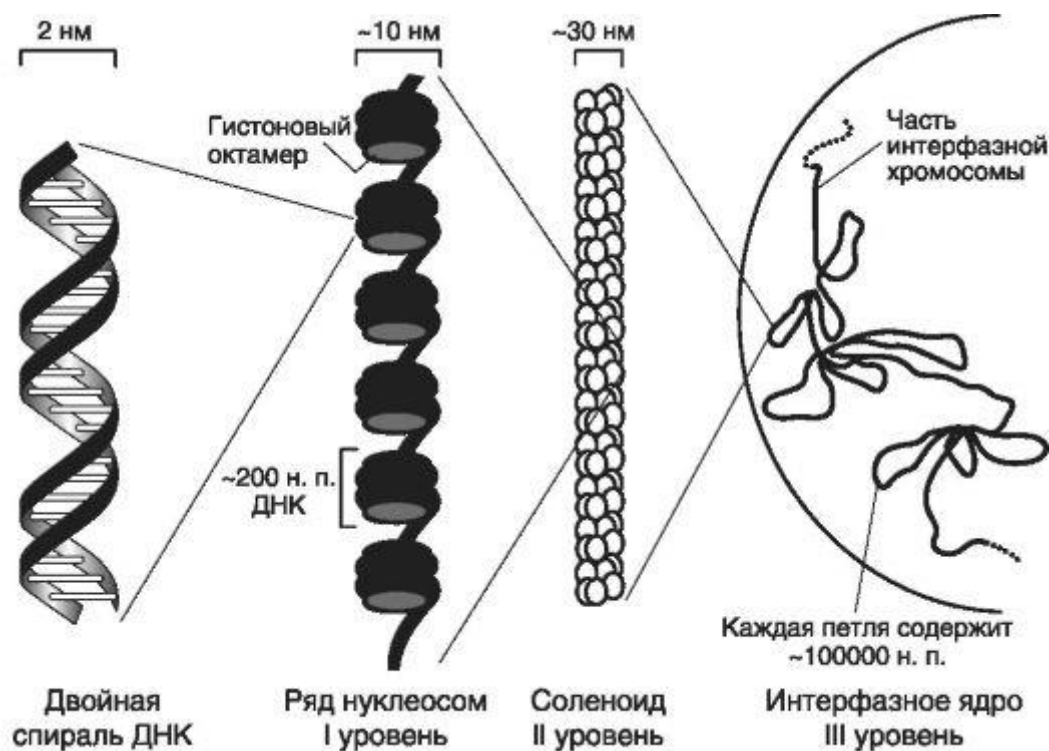


Рис.

8. Уровни структурной организации хромосомной нити (по Томпсон М. и соавт., 1991)

Например, вторичные перетяжки длинных плеч хромосом 1, 9 и 16, коротких плеч акроцентрических хромосом и длинного плеча Y-хромосомы бедны структурными генами или не содержат их вообще.

Наоборот, эухроматин реализует информацию посредством мРНК.

Хромосома - структура с большим преобладанием линейного размера над поперечным. В метафазе митоза общая длина гаплоидного набора хромосом при средней степени их конденсации составляет около 1500 мкм с поперечником хроматиды около 0,5 мкм. Сопоставление этих величин говорит об исключительных масштабах физического преобразования хромосомной нити при ее переходе из интерфазного в метафазное состояние, включающем два взаимосвязанных процесса: многократное уменьшение длины и многократное увеличение поперечника хромосомы.

Митохондриальная ДНК

Митохондриальная ДНК (мтДНК) представляет собой полуавтономную генетическую систему, работающую под контролем ядерной ДНК. Это единственная кольцевая ДНК, имеющая размер в 16 569 н.п. (рис. 9).

В настоящее время описаны особенности строения и функционирования мтДНК (их не менее 10), отличающиеся от ядерной ДНК.

Во-первых, мтДНК полуавтономна (существует возможность ее переноса между культивируемыми клетками человека в процессе слияния и разъединения органелл).

Во-вторых, мтДНК поступает в клетку исключительно по материнской линии (см. главу 26).

В-третьих, мтДНК подвергается репликативному отбору как при митозе, так и при мейозе. Поэтому в одной клетке обнаруживается смесь мутантной и нормальной мтДНК (гетероплазмия).

В ходе митотического и мейотического цитокинеза доля и той, и другой мтДНК значительно варьирует в дочерних клетках вплоть до образования в них гомоплазмии.

Названные механизмы имеют большое значение в развитии митохондриальных болезней, при которых расстройства энергетического метаболизма в клетках прямо пропорциональны доле мутантных копий мтДНК в митохондриях; она составляет от 0 до 100%.

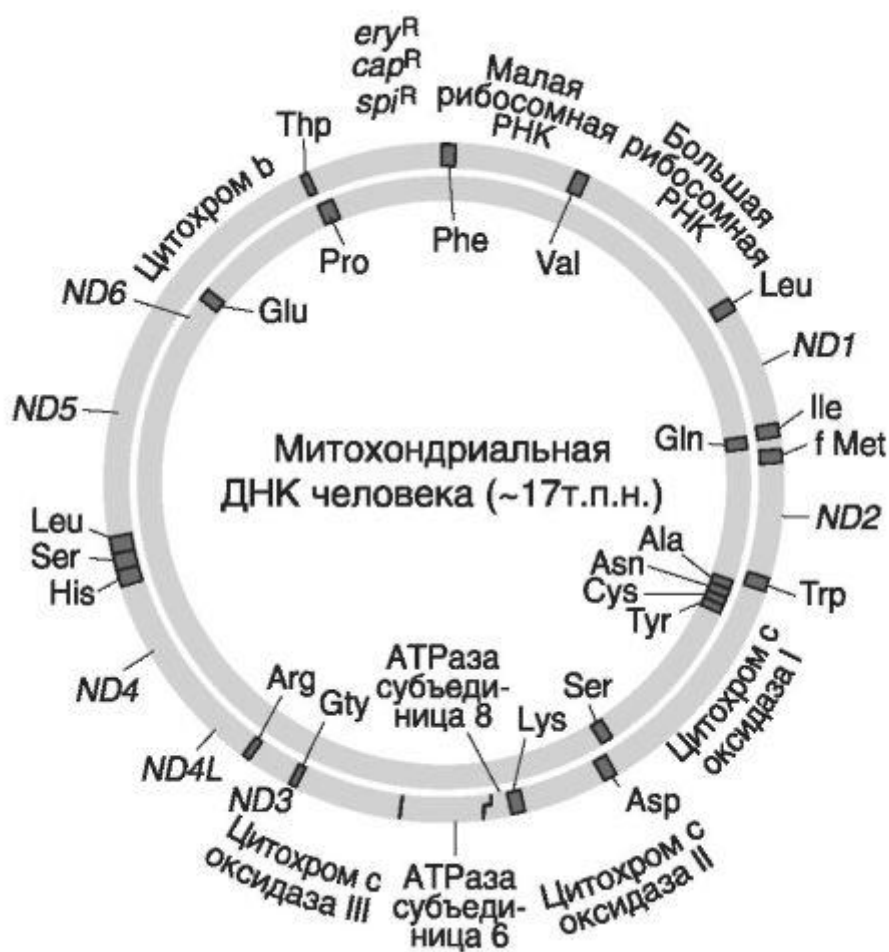


Рис. 9. Карта

мтДНК у человека (по: Гриффитс А. и соавт, 2000)

В-четвертых, для мтДНК характерен феномен пороговой экспрессии (доля мутантных копий) в той или иной ткани. Пороговая экспрессия наиболее высока в нервной ткани, поперечно-полосатых мышцах, сетчатке глаз, островках Лангерганса и других тканях.

В-пятых, эволюционная изменчивость мтДНК в 10-20 раз выше, чем ядерной ДНК (в первом случае мутации возникают чаще, чем во втором).

Хотя только 20% участников (компонентов) процессов окислительного фосфорилирования кодируются генами митохондриального генома, а остальные 80% - генами ядерной ДНК, нарушения тканевого дыхания возникают гораздо чаще из-за мутаций в мтДНК.

В-шестых, в мтДНК нет интронов.

В-седьмых, в большей части мРНК, содержащейся в мтДНК, отсутствуют 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности.

В-восьмых, двойное кольцо мтДНК имеет внутреннюю тяжелую цепь (Н-цепь) и внешнюю легкую цепь (L-цепь). У них разная плотность генов: в первой цепи больше пурина, во второй - пиримидина.

В митохондриальной ДНК есть в легкой цепи не кодирующий район (или D-петля), служащий регуляторной областью и местом локализации участка начала репликации Н-цепи и транскрипции.

Синтез Н-цепи идет по часовой стрелке вокруг мтДНК; после прохождения 2/3 цепи начинается репликация L-цепи против часовой стрелки, т.е. репликация мтДНК - двухступенчатый асинхронный процесс.

В-девятым, выявлены отличия генетического кода мтДНК от кода ядерной ДНК. Например, метионин в мтДНК кодирует кодон АУА, а в ядерной ДНК - кодон АУГ; стоп-кодона мтДНК - триплеты АГА и АГГ, тогда как в ядерной ДНК они кодируют аргинин.

В-десятым, наличествуют и другие особенности, связанные с транскрипцией, локализацией ферментов и т.д.

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ СТРУКТУРНОЙ ГЕНОМИКИ

Ген и модель его общей структуры

Под понятием «ген» подразумевается структурно-функциональная единица наследственного материала (генома).

Ген - это участок молекулы ДНК, кодирующий молекулу полипептида (белка), молекулы мРНК, рРНК, тРНК.

В последние годы произошло очередное уточнение понятия. Теперь считается, что ген - *ассоциированный с регуляторными последовательностями фрагмент молекулы ДНК, соответствующий единице транскрипции на хромосоме.*

Согласно модели общей структуры гена, он - «конкретная единица молекулы ДНК (ее кодирующая и не кодирующая части) с расположенными по флангам регуляторными последовательностями».

Ген имеет (рис. 10) слева 5'-конец (начало гена), а справа 3'-конец (окончание гена); между ними находятся экзоны, интроны и другие структуры.

Исключением из этой модели являются гены альфа- и бетаинтерферонов, гистонов и гены мтДНК, у которых нет интронов.

Место расположения гена в хромосоме (его позиция в ней) называется генным (генетическим) локусом.

Состояние локуса играет принципиальную роль: в компактном виде он интактен, и РНК-полимераза лишена доступа к промотору. В результате декомпактизации локус приобретает форму петли, связанной с ядерным матриксом (внутренний белковый скелет ядра).

- Участок сигнала полиаденилирования.

Почти все мРНК имеют «поли-А-хвост», присоединяющийся к 3'-концу перед выходом молекулы мРНК из ядра. Считается, что «поли-А-хвост» защищает мРНК от быстрой деструкции, ибо деаденилирование часто ей предшествует.

Предполагается также, что такой «хвост» влияет на транспорт, трансляцию и распад мРНК, значительно сокращая период ее полужизни.

В последние годы обнаружен белок, связывающийся с «хвостом», но механизм его действия пока неясен.

Размеры других генов человека весьма вариабельны. Как отмечалось, самый короткий из них - бета-глобиновый ген, ну а самый протяженный - ген дистрофина (2,2 млн н.п. и более 2000 экзонов).

Зная размеры гена, можно выяснить размер кодируемого им белка (и наоборот), поскольку одна аминокислота закодирована тремя нуклеотидами. Например, белок, кодируемый геном с размером 3000 н.п., содержит 1000 аминокислотных остатков.

Свойства гена как единицы функционирования

Главное свойство гена - его экспрессия или работа, в ходе которой последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК переводится в последовательность аминокислот в молекуле полипептида (см. главу 3).

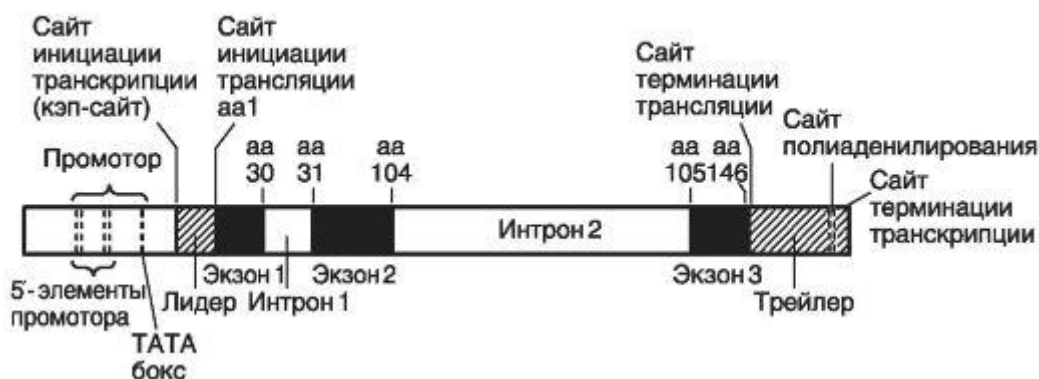


Рис.

11. Структура бета-глобинового гена человека (по: Гилберт С., 1995)

Следующее свойство гена - аллельное состояние. Организационная структура гена - диаллельная модель (рис. 12), т.е. большинство генов существуют в виде двух альтернативных вариантов - аллелей, локализованных в одинаковых (идентичных) локусах на гомологичных хромосомах.

В диплоидной клетке каждая пара гомологичных хромосом содержит одну хромосому отцовского происхождения (имеет отцовские аллели) и другую хромосому материнского происхождения (материнские аллели).

Гены, расположенные в одинаковых локусах на гомологичных хромосомах, называются аллельными генами, т.е. у каждой пары родительских генов одна материнская и одна отцовская копии (аллели) одного и того же гена.

Если гены одной родительской пары находятся в разных (неидентичных) локусах как гомологичных, так и негомологичных родительских пар хромосом, то это неаллельные гены.

В классической генетике выделен ряд понятий, связанных с аллельными генами.

Во-первых, «гомозиготность» и «гетерозиготность». Термины введены в 1903 г. одним из основоположников генетики - англичанином Вильямом Бэтсоном.

В случае гомозиготности каждый из двух аллелей одного и того же гена обладает одинаковой по содержанию информацией. В случае гетерозиготности каждый из двух аллелей одного гена обладает разной по



Рис.

12. Диаллельная модель организационной структуры гена. Гомологичные хромосомы: отцовская (верхняя) и материнская (нижняя); p - короткое плечо; q - длинное плечо; C - центромера; A, B и B - идентичные генные локусы длинных плеч двух хромосом и содержащиеся в них аллельные копии одного гена (соответствуют местам пересечения пунктирных линий с хромосомами) содержанию информацией. Организмы с такими аллельными парами называются гомозиготными и гетерозиготными соответственно.

Во-вторых, аллельные и неаллельные гены образуют в одной и той же клетке две группы родительских генов (отцовскую и материнскую по происхождению).

В каждой группе любой ген отличается от альтернативного ему гена по содержанию информации, закодированной в его нуклеотидной последовательности.

В-третьих, если речь идет о совокупности (сцеплении) аллелей одного и того же гена (например, аллелей полиморфного маркера), то такое состояние называется гаплотипом (см. ниже), а локусы, где расположены подобные аллели, называются полиморфными локусами (см. ниже). Их в геноме у человека выделено около 6 тыс.

Обнаружение в одной популяции неравновесия в сцеплении полиморфных аллелей одного локуса позволяет определить точку повреждения гена (точковую мутацию) и время (возраст) ее появления.

Другие свойства гена.

- Дискретность. У биологического вида развитие разных признаков контролируется разными генами, локализованными в разных локусах на разных хромосомах. Например, ген хореи Гентингтона расположен на коротком плече хромосомы 4, сегмент 1, подсегмент 6 (записывается как 4p16), ген атаксии Фридрейха - на длинном плече хромосомы 9, сегменты 1 и 2, подсегменты 3 и 1.1 (записывается как 9q13-q21.1).

- Дозированность. Ген обуславливает развитие признака до определенного количественного предела (дозы); параллельно дозе гена усиливается выраженность (экспрессивность) признака. Превышение дозы в рамках одного биологического вида не наблюдается. Например, у человека размеры ушной раковины или длина спинки носа имеют определенные пределы, характерные для Homo sapiens, и никогда не достигнут размеров ушной раковины или длины хобота у слона.

- Специфичность. Ген обеспечивает развитие только определенного признака или их группы. Например, ген, контролирующий окраску глаз, не способен сформировать такой признак, как курчавость волос.

В случае развития группы признаков под влиянием одного гена речь идет о *плейотропном действии* или эффекте (см. главу 5). Например, ген атаксии-телеангиэктазии (11q22.3) ответственен за следующие признаки: нарушение координации и походки, появление сосудистых звездочек (телеангиэктазий) на склерах, коже, слизистых оболочках органов дыхания и пищеварения, а также иммунодефицит и др.

- Стабильность. При отсутствии мутаций (нарушений структуры и функции) ген передается в ряду поколений в стабильном виде (см. главу 5).

Гаплотип

Гаплотип - совокупность или сочетание (сцепление) аллелей одного и того же гена.

Аллели, входящие в гаплотип, происходят из одного базового аллеля, т.е. для них характерен «эффект основателя».

Новые аллели мутантного гена, сформированные на отцовской или материнской хромосоме, в последующих поколениях постепенно «размываются» за счет рекомбинационной изменчивости и меняют содержание информации о признаке.

Аллели одного гаплотипа, как и множественные аллели одного гена (см. ниже), кодируют количественные признаки. Однако для вторых аллелей не характерен «эффект основателя».

Классификация генов

Гены человека делятся на ряд классов: белок-кодирующие; гены, кодирующие РНК; гены РНК-полимераз; митохондриальные гены.

Класс белок-кодирующих генов: это общеклеточные гены (гены «домашнего хозяйства»); тканеспецифические гены (гены терминальной дифференцировки или специфически функционирующие гены); гены, кодирующие транскрипционные факторы: PAX I-9, HOX I-9, SOX I-10 (см. главу 8); ген SRY (ген, определяющий мужской пол). В последние годы в этот класс включены гены, контролирующие:

- структуру белков, участвующих в процессах синтеза аминокислот, азотистых оснований и сахаров;
- синтез белков, обеспечивающих матричные процессы (репликацию, транскрипцию и трансляцию).

Следует выделить уникальные особенности строения некоторых белок-кодирующих генов - они включают две области: структурную часть и фланкирующие регуляторные участки с 5'- и 3'-сторон. Например, глобиновые гены человека образуют два мультигенных семейства (кластера), структурно напоминающих оперон у прокариот, но без общих регуляторных участков (промотора, оператора и терминатора), ибо каждый кластер имеет свои регуляторные участки. В частности, первый кластер альфа-глобиновых генов локализован в коротком плече хромосомы 16 в определенной последовательности: сначала идут последовательности генов, кодирующих цепи эмбриональных гемоглобинов, затем - цепи трех псевдогенов, а ближе к 3'-концу - цепи генов альфа 1 и 2.

Второй кластер бета-глобиновых генов расположен в коротком плече хромосомы 11 в следующей последовательности: сначала ген эмбриональной цепи, затем 2 гена фетальных цепей HbF, которые отличаются по одному кодону, потом один псевдоген бета-цепи, сигма-ген, кодирующий сигма-цепь гемоглобина взрослого человека HbA₂, и бета-ген.

Эти гены функционируют на разных этапах онтогенеза в той же последовательности.

Класс РНК-кодирующих генов: гены, отвечающие за синтез мРНК, рРНК, тРНК и мяРНК.

Гены тРНК повторяются умеренно, числом достигая 1300. Особенность их строения: расчлененный и находящийся внутри гена промотор, один блок которого расположен на расстоянии 8-30 н.п. слева от инициаторного кодона, а второй блок - справа, на расстоянии 51 н.п.

Сам промотор содержит А- и В-боксы с каноническими последовательностями. Если расстояние между боксами уменьшается, то уровень транскрипции снижается либо транскрипция полностью прекращается. В свою очередь, замена одного нуклеотида в В-боксе искажает структуру тРНК.

Крайне интересны данные о ранее неизвестных молекулах мяРНК. По-видимому, они участвуют в образовании гибридных молекул сложных рибопротеиновых частиц, называемых сплайсосомами. Процесс формирования сплайсосом идет путем спаривания с основаниями консенсусных последовательностей ДНК или меток сочленений экзонов с интронами: GU-начало метки и AG-конец метки. Такое спаривание происходит в местах сплайсинга на первичном РНК-транскрипте, что определяет интроны, подлежащие удалению.

Мутации в мяРНК могут привести к неправильному сплайсингу, влекущему за собой невозможность удаления интронов из РНК-транскрипта. Например, при бета-талассемии не происходит образования нормальных количеств бета-гемоглобина из-за замены гуанина на аденин в 5'-конце, что вызывает блок процессинга мРНК.

Иными словами, молекулы мяРНК катализируют химические процессы.

В последние годы предложена новая классификация, где в зависимости от типа транскрибируемых РНК-полимераз выделяют 3 класса генов:

- гены рРНК, транскрибируемые РНК-полимеразой I (это гены 18S; 5,8S и 28S);
- гены, транскрибируемые РНК-полимеразой II (это гены, кодирующие белки);
- гены, транскрибируемые РНК-полимеразой III (это гены 5SpРНК, тРНК и мяРНК).

Класс митохондриальных генов: 37 генов, не содержащих интронов: гены рибосомных [^]S-рРНК и [^]S-рРНК; 22 гена тРНК; гены трех субъединиц цитохром-с-оксидазы; гены шестой и восьмой субъединиц АТФ-азы; ген цитохрома b; гены семи субъединиц NADH-дегидрогеназы.

Генетический полиморфизм

Генетический (геномный) полиморфизм (ГП) - вариации наследственного материала в пределах одного биологического вида (или основа разнообразия людей).

В классической генетике понятие ГП соответствует нескольким наследственным вариантам, из которых наиболее редкий вариант встречается с частотой, превышающей частоту обратного мутирования (см. главу 5).

Если говорить о ГП как о генетических маркерах признаков организма, то их можно считать полиморфными только тогда, когда наиболее редкий их вариант встречается чаще, чем в 1% случаев.

Речь идет о частоте встречаемости четвертого варианта диаллельной модели, когда изменены обе аллельные копии одного и того же гена.

Как известно, при *первом варианте* и материнская, и отцовская копии сохраняют стабильную наследственную информацию о признаке; *второй вариант* - материнская копия несколько изменена, а отцовская - нет; *третий вариант* - отцовская копия несколько изменена, а материнская - нет; *четвертый вариант* - обе копии несколько изменены.

Наличие разных вариантов существования диаллельной модели традиционно (хотя и не совсем верно) считается множественным аллелизмом (см. выше). Но так как аллелей всего только два, а вариантов не менее четырех (точнее, их всегда гораздо больше), то правильнее следовало бы назвать такое состояние многовариантностью существования двух аллелей одного и того же гена.

Вместе с тем, известны серии множественных аллелей. Мутации в них по отношению друг к другу могут быть доминантными, рецессивными, а также вероятны неполное доминирование, сверхдоминирование, кодоминирование, условное доминирование, плейотропный эффект (см. главу 4).

Локусы, в которых расположены такие аллели, называются полиморфными (см. выше). Например, у человека в полиморфных локусах находятся полиморфные семейства молекул HLA-антигенов и IP классов (см. главу 15).

Другой пример полиморфности локусов - разная частота распространенности IV группы крови (по классификации ABO): среди населения ряда регионов мира она встречается у 3-4%, тогда как в других регионах - у 10-12%.

В молекулярном плане ГП - это *наличие небольших (совместимых с жизнью) нарушений структуры нуклеотидов в молекуле ДНК* (нарушений порядка последовательности) и, следовательно, в молекуле белка (см. главу 3).

В структурной геномике главной формой молекулярного полиморфизма является однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) или варианты последовательностей ДНК у разных лиц с вовлечением одной пары нуклеотидов. ОНП характерен для 93% генов человека.

Выделяют *качественный и количественный ГП*. *Первый* представляет собой замену одного нуклеотида (или SNP), его частота 1:300 н.п. *Второй* - повторы нуклеотидов с различной степенью выраженности.

ГП - это также вариабельность числа tandemных повторов (одинаковые повторы следуют друг за другом) или STR в виде одного, двух, трех повторов и более.

Если протяженность tandemных повторов еще больше (от 10 до 100 нуклеотидов), то имеет место *генетический полиморфизм по размеру повторов*, или VNTR.

Кроме того, в геноме человека выделены области протяженной гомологии, возникшей в результате дупликации относительно крупных фрагментов ДНК. Их эволюционное значение трудно переоценить. Например, рассмотрим дупликацию фрагментов ДНК, включающих ген CYP21 - ген цитохрома P₄₅₀ - и гены комплемента. В ходе эволюции одна из копий гена - ген CYP2[^] - порой «накапливает» мутации и лишается активности, превращаясь в псевдоген. В результате между псевдогеном CYP2[^] и сохранившим свою активность геном CYP2[?] может произойти генная конверсия (в гомологичных хромосомах) с перемещением участка гена CYP2[?] на ген CYP2[^]; или возникнет делеция гена CYP2[?], обусловив развитие адреногенитального синдрома с гиперплазией коры надпочечников, вызванной недостаточностью 21-гидроксилазы.

Другой пример - дупликация гена миелинового белка PMP22; она вероятна в результате гомологичной рекомбинации между крупными повторами (REP), фланкирующими содержащую ген область ДНК (1,5 млн н.п.). Такая дупликация - наиболее частая причина *неверальной амиотрофии Шарко-Мари-Тус*.

Вместе с тем делеция гена, кодирующего этот белок, ведет к менее тяжелой по проявлениям болезни - *наследственной нейронпатии*.

Еще одна важная особенность ГП - различия между аллелями по числу копий повтора.

Исключение из этого правила - тринуклеотидный повтор цитозин-аденин-гуанин - ЦАГ (кодон глутаминовой кислоты), способный включаться в структурные гены в случае болезней экспансии числа нуклеотидных повторов (см. главу 28).

В целом установлено: разнообразные аллельные формы ГП могут образовываться за счет точковых мутаций, рекомбинаций и неравного кроссинговера.

В настоящее время создаются карты SNP, насыщенные SNP- маркерами. С их помощью проводится идентификация генов, ответственных за широко распространенные мультифакториальные и онкологические заболевания, болезни с отсроченной манифестацией признаков.

Особая роль принадлежит полиморфизму митохондриальной ДНК

(мтДНК).

В зиготе и во всех произошедших из нее соматических клетках при формировании многоклеточного организма транскрибируются и затем транслируются обе цепи мтДНК материнского происхождения, образующие единый транскрипт, расщепляющийся по сайтам, расположенным по обе стороны от каждого гена тРНК. Большая часть генов тРНК (14 из 22) транскрибируется по часовой стрелке. После вырезания тРНК из мтДНК освобождаются молекулы рРНК и мРНК.

В случае возникновения мутаций в мтДНК в клетке наблюдается гетероплазмия или присутствие разных типов мтДНК (нормальная и мутантная); при гомоплазмии все типы мтДНК одинаковые.

Мутации в мтДНК делятся на точковые и структурные (делеции). Они ведут к изменению белков, входящих в комплексы дыхательной цепи митохондрий, и, следовательно, обуславливают снижение энергетического обеспечения клеток или дефицит синтеза АТФ, что ведет к болезням тех органов и тканей, в которых происходят энергоемкие процессы.

ГЕНОТИП И ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ

Генотип человека

Генотип - совокупность всех генов организма (или полигенный комплекс). Регистрируемый результат действия генотипа - фенотипическое проявление (см. главу 3).

Уточнение о фенотипическом проявлении необходимо потому, что в геноме человека наряду с кодирующими последовательностями ДНК имеются некодирующие, неэкспрессирующиеся (нетранскрибирующиеся) последовательности без фенотипического проявления - псевдогены (или ложные гены).

В результате выполнения международной программы «Геном человека» установлено: генотип человека включает 35-40 тыс. генов. Такие данные соответствуют ранее известным - о выделении 35 тыс. типов мРНК в культуре злокачественных клеток человека, названной клетками HeLa (инициалы одной онкологической больной). Каждый тип мРНК есть результат транскрипции индивидуального структурного гена (для сравнения: генотип кишечной палочки - 4 тыс., дрожжей - 7 тыс. генов).

Генотип человека с одной стороны - основа его гомеостаза (см. ниже), а с другой стороны - основа программы его онтогенеза.

В частности, индивиды с генотипами, не обеспечивающими подавление отрицательного действия патологических генов и факторов среды, оставляют меньше потомков, чем те, у которых нежелательные эффекты подавляются.

Подавление генотипом отрицательных эффектов зависит от активности имеющихся в любой клетке генов-модификаторов. Они модифицируют действие нормальных аллелей в аллельных и неаллельных парах таким образом, что те начинают оказывать доминантное влияние на патологические гены.

В целом же генотип - основа эволюционной стабильности биологического вида, обеспечиваемой уникальными свойствами молекулы ДНК. В свою очередь, стабильность генотипа обуславливает надежность гомеостаза как отдельных клеток, так и организма в целом.

Гомеостаз и системный характер организации молекулярной жизни

Гомеостаз - фенотипическое проявление генотипа, свойство организма сохранять постоянство (целостность) внутренней среды при совместимых с жизнью условиях внешней среды.

Гомеостаз базируется на стабильности разнообразных и бесконечных в течение жизни генетически детерминированных преобразований или межмолекулярных реакций, сложившихся в ходе эволюции. Среди них реакции: ДНК-ДНК, ДНК-РНК, РНК-РНК, белок-ДНК, белок-РНК, белок-белок, белок-субстрат.

Выделяют разные виды гомеостаза:

- структурный гомеостаз, целостность морфологической организации на разных уровнях дискретности организма;
- химический гомеостаз, целостность состава внеклеточной (жидкой) части внутренней среды (кровь, лимфа, цереброспинальная жидкость);
- гомеостаз метаболических процессов в печени, почках, мышцах и других органах;
- гомеостаз газообмена в легких;
- гомеостаз кислотно-щелочного состояния крови;

- гомеостаз буферных свойств гемоглобина и т.д.

Многие из указанных видов гомеостаза имеют общие механизмы и тесно связаны друг с другом.

Именно объединение отдельных видов гомеостаза в целостную приспособительную систему организма в ответ на действие факторов внешней среды отражает системный характер организации различных форм молекулярной жизни (см. главы 7 и 8).

Такое объединение достигается за счет совместного функционирования основных регуляторных (и одновременно защитных) систем организма: нервной, эндокринной, иммунной, ферментной (см. главы 13-15). Эти системы различаются по скорости и времени сохранения ответа на действие факторов внешней среды (раздражителей). Относительно быстрые реакции организма обеспечиваются нервной системой.

Гормональные и иммунные воздействия распространяются на клетки, ткани и органы гораздо медленнее, чем нервные импульсы, но зато и сохраняются более длительное время.

Наглядным примером генерализованного ответа на необычное по силе и продолжительности воздействие раздражителей служит стресс-реакция, обуславливающая быстрое привлечение энергетических ресурсов для адаптации организма к новым условиям.

При действии раздражителей сигналы из анализаторных отделов коры головного мозга поступают в гипоталамус, передающий их гипофизу, где резко возрастает синтез гормонов, и они выбрасываются в кровь. Включаются три основные «эндокринные оси»: адренокортикотропная, соматотропная и тиреоидная - они связаны с активностью надпочечников и щитовидной железы. Затем происходят соответствующие изменения в состоянии других систем. Общий итог - повышение уровня сопротивляемости организма.

Известны два способа генетического контроля гомеостаза.

Первый способ - контроль за элементарными реакциями непосредственно в клетке (например, пассивный транспорт веществ, синтез ферментов).

Второй способ - контроль за более сложными реакциями, протекающими на уровне органов и систем организма (например, регуляция функций на основе нормы реакции, регуляция иммунитета, мышечной и нервной активности, умственной деятельности и др.).

ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО РАЗМЕРЫ

Геном человека - полная генетическая система, ответственная за происхождение, развитие и наследование всех структурных и функциональных особенностей организма.

С молекулярных позиций геном человека - одинарное количество нуклеотидных последовательностей ядерной ДНК и мтДНК, распределенных по 25 хромосомам (22 аутосомы, X-хромосома, Y-хромосома и хромосома, условно названная митохондриальной). Относительно всех 25 хромосом - это их полный гаплоидный набор.

Митохондриальная хромосома (в отличие от ДНК аутосом и гоносом) и ее мтДНК не связаны с белками, т.е. она существует в «голом виде» (см. выше).

В гаплоидном наборе хромосом молекулярная масса ДНК равна $3,6 \times 10^{-12}$ г. В диплоидном наборе она в 2 раза больше: $7,3 \times 10^{-12}$ г.

В настоящее время выделяют три параметра, характеризующие размеры генома при диплоидном наборе хромосом: физический, генетический и цитогенетический. У человека имеют место следующие параметры.

- *Физический размер* - $3,1467 \times 10^9$, или 3,1467 млрд н.п. ДНК. В соматической клетке количество ДНК в 2 раза больше: $6,3 \times 10^9$ н.п.
- *Генетический размер* - 3,0-3,5 тыс. сантиморганид [См] (общее количество генетических обменов между гомологичными хромосомами в ходе одного мейоза).
- *Цитогенетический размер* - 2,5-3,0 тыс. полос (бэндов), выявляемых на всех хромосомах при дифференциальном (прометафазном) окрашивании.

О размерах генома и генотипа человека судят исходя из следующего примера: если деспирализовать ДНК всех 25 хромосом и вытянуть каждую из них в отдельную ниточку, а затем состыковать все ниточки конец в конец, то общая длина хромосомной ДНК составит 120-130 см (суммарная длина всех нуклеотидных последовательностей ДНК). Но общая длина только экзонной части ДНК - всего 8-10 см (суммарная длина нуклеотидных последовательностей, входящих в экзонную часть ДНК).

Следует указать на отсутствие корреляции между размерами биологического вида и размерами его генома (для сравнения: у саламандры и лилии размер генома почти в 30 раз больше, чем у человека).

Кариотип, кариотип человека

Кариотип - полный набор хромосом соматической клетки конкретного биологического вида с учетом количества, формы, размера, структуры (при дифференциальном окрашивании) и других особенностей.

Кариотип человека - совокупность морфологических особенностей полного хромосомного набора ядра соматической клетки, свойственная виду *Homo sapiens* (для женского пола - 46,XX; для мужского пола - 46,XY, т.е. двойной, диплоидный набор хромосом, включающий 44 аутосомы и 2 половые хромосомы - гоносомы).

Популяция, популяция человека

Популяция - совокупность особей одного биологического вида (группы видов), постоянно находящихся (проживающих) на ограниченной географической территории.

Как сказано в главе 1, термин впервые ввел В. Иогансен в 1903 г. для обозначения неоднородной группы особей одного биологического вида. В 1926 г. С.С. Четвериков, изучавший разнообразие популяций, стал основателем нового научного направления - популяционной генетики; в ней наиболее важными факторами считаются естественный отбор и изоляция.

Популяция человека - совокупность всех людей Земли (примерно 6,5 млрд человек).

Генофонд человека и его свойства

Генофонд человека - совокупность всех генов (генотипов) в общей популяции человека как биологического вида (гены всех живущих на Земле людей).

Понятие «генофонд» впервые ввел А.С. Серебровский в 1928 г.

Основные свойства генофонда: генетическая целостность; глубокая дифференцированность (или неоднородность) генотипов при сохраняющейся общей

совокупности генов и целостности генофонда; зависимость генофонда современного человека от генофонда его предков; наличие генетического груза (см. ниже).

Первые три свойства (особенно первое) обеспечивают сохранение (бессмертие) человека как вида *Homo sapiens* на основе непрерывного воспроизводства (репродуктивного процесса).

Репродуктивный процесс у человека

С генетической точки зрения, репродуктивный процесс у человека есть воспроизводство новых генотипов в каждом последующем поколении на основе слияния двух родительских генотипов.

В ходе такого воспроизводства осуществляется постоянный обмен наследственным материалом между организмами женского и мужского пола, формируются новые генотипы их потомков, и каждое новое поколение потомков представлено генотипами, содержащими около 50% генов каждого родителя.

Репродуктивный процесс, осуществляемый в каждом поколении человека, вносит свой вклад (большой или малый) в генофонд человека, зависящий от жизнеспособности и репродуктивной активности каждого потомка в окружающей его среде обитания.

Условия окружающей среды по-разному влияют на жизнеспособность и репродуктивную активность разных людей (разных генотипов). Поэтому генофонд человека (человечества) постепенно изменяется (совершенствуется) в результате естественного отбора, и более приспособленные люди (генотипы) чаще выживают и оставляют потомство, сохраняя, однако, генетическую целостность генофонда.

Таким образом, биологический смысл репродуктивного процесса у человека заключается в передаче из поколения в поколение и сохранении целостности генофонда.

Генетический груз у человека

Генетический груз как одно из свойств генофонда человека прямо связан с геномным, протеомным и репродуктивным здоровьем человека (см. главу 1). Еще в 1932 г. Г. Мёллер дал определение генетического груза как меньшей части общей популяции с измененной наследственностью. Сюда относят людей с наследственной патологией, развившейся в результате отрицательного действия факторов окружающей среды или переданной от предыдущих поколений.

Такие люди менее приспособлены к выживанию, часто подолгу болеют и избирательно гибнут в процессе естественного отбора. Продолжительность их жизни почти в 2 раза меньше, чем у здоровых людей.

ГЛАВА 3 ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА (ПРОТЕОМИКА) ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

Эволюция человека сформировала на основе молекулы ДНК внутриклеточные генетические процессы; основной из них - биосинтез полипептидных цепей (белков) как главных носителей биологических функций клетки и организма.

Производство белков в рибосомах клетки основано на механизме перевода наследственной информации, зашифрованной в последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, в последовательность аминокислот в молекуле полипептида - это механизм экспрессии (работы) генов или главный механизм функционирования генов.

Рассмотрим вопрос: что с молекулярных позиций представляют собой экспрессия генов и результаты ее реализации - белки?

Экспрессия генов - механизм передачи наследственной информации от молекулы ДНК с помощью различных типов РНК к молекуле полипептида, односторонний поток информации (ее путь) из ядра в рибосомы цитоплазмы клетки (рис. 13). Основные звенья экспрессии генов:

- ядро клетки, в котором происходят расплетение нитей молекулы ДНК, транскрипция мРНК с помощью РНК-полимеразы II, процессинг и сплайсинг (созревание) мРНК;
- цитоплазма клетки, в которой происходят транспорт созревшей мРНК от ядра к рибосомам, перевод (трансляция) с помощью рРНК и тРНК информации о последовательности нуклеотидов в молекуле мРНК в последовательность аминокислот в молекуле белка.

Благодаря механизму генной экспрессии в клетке образуется множество молекул мРНК; число их соответствует числу генов, активных в момент экспрессии.

Подразумевается, что одна молекула мРНК приносит в рибосомы информацию о конкретной последовательности нуклеотидов, на основе которой рРНК формирует в них конкретную последовательность аминокислот, поставляемых с помощью тРНК (см. главу 2).

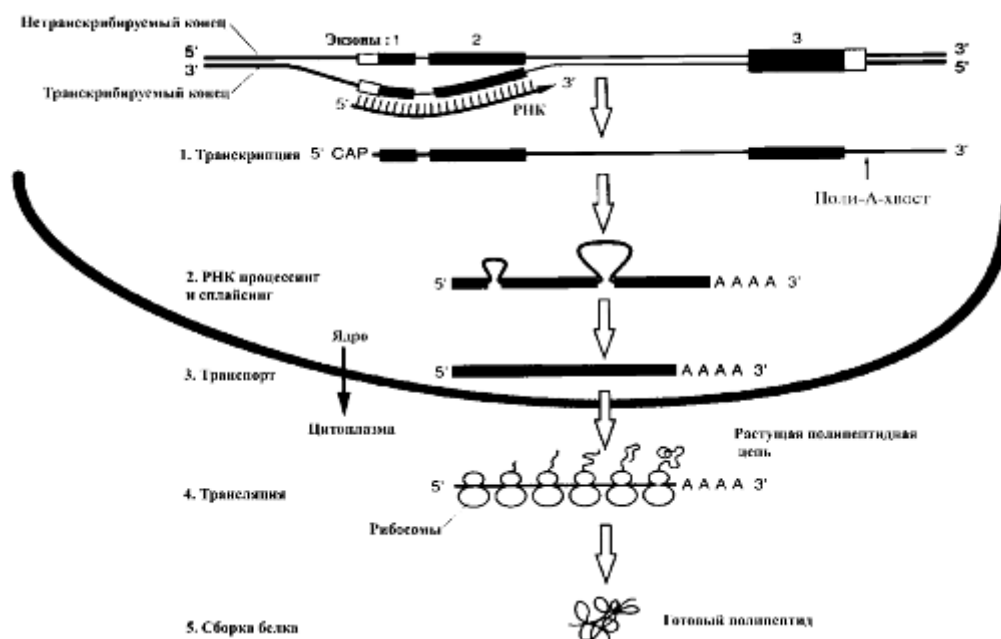


Рис.

13. Механизм экспрессии генов (по В. Эллиот, Д. Эллиот, 2002)

Все эти процессы происходят при участии ряда ферментов, и в результате из рибосом выходят белковые (полипептидные) цепочки (рис. 14).

Как сказано выше, образование копий мРНК обеспечивает РНК-полимераза II. Именно она служит для таких молекул своеобразной «штамповочной машиной». РНК-полимераза II выполняет еще ряд функций, например, отбор подлежащих экспрессии генов, определение в гене места, откуда надо начинать копирование ДНК, и места, где следует остановиться, а также контроль скорости, времени экспрессии и количества производимого белка. В последние годы установлено: для образования в молекуле ДНК

основного инициаторного комплекса или кэп-сайта, к которому присоединяется РНКполимераза II в ходе транскрипции гена (см. главу 2), требуется ряд

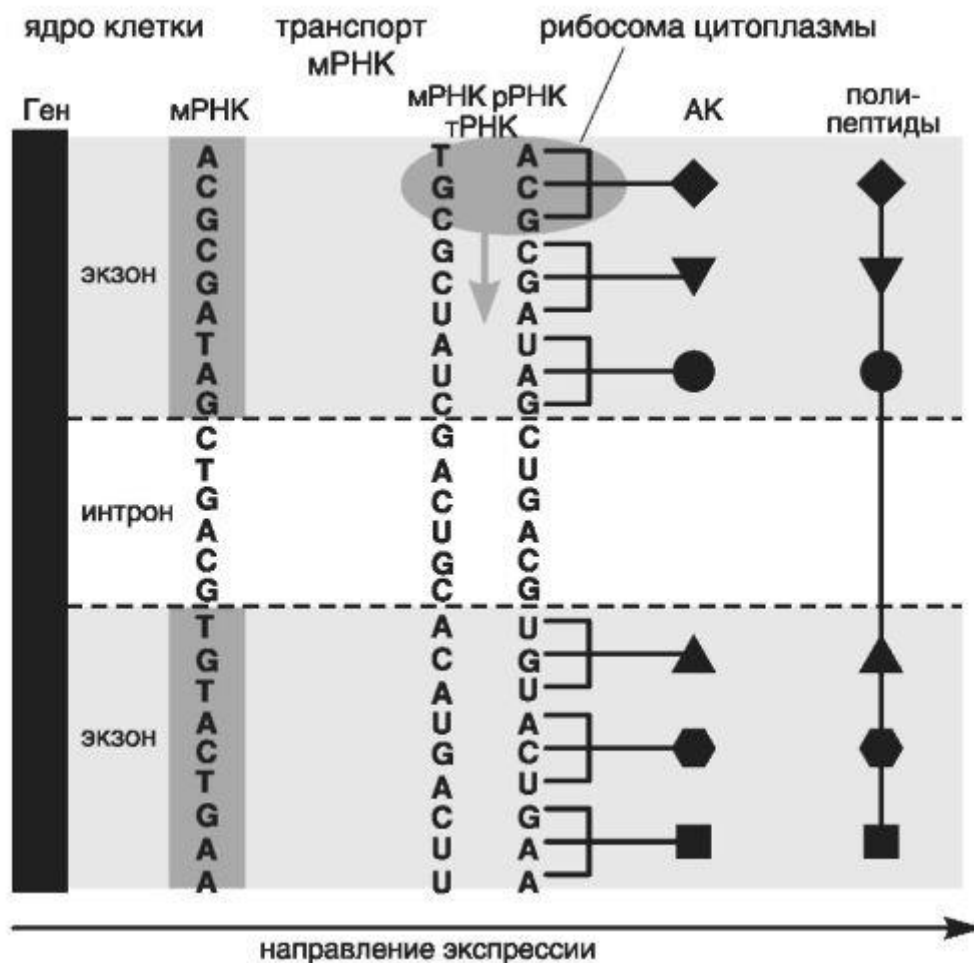


Рис.

14. Примерная схема формирования полипептидов из аминокислот (АК) при взаимодействии мРНК, рРНК и тРНК в рибосомах цитоплазмы специфических белков - факторов транскрипции. В настоящее время их выделено несколько сотен (см. главу 8). Они присутствуют во всех клетках, в том числе среди них есть ТВР-белок или ТАТА-белок, присоединяющийся к ТАТА-боксу (см. рис. 11). С ТАТА-боксом связаны около 10 ТАФ-белков (или ТВР-связывающих факторов). Они формируют TFPD-комплекс, фактор транскрипции D для РНК-полимеразы II и белков, образующих ОИК. Вышеперечисленное происходит в генах, имеющих ТАТА-боксы.

Если ТАТА-бокса нет, то кэп-сайт собирается в инициаторной области гена, но, по-видимому, уже с использованием другого фактора (для достижения правильного положения РНК-полимеразы II).

Кроме основного фермента - РНК-полимеразы II, у человека выделены РНК-полимераза I (транскрибирует большую часть молекул рРНК) и РНК-полимераза III (транскрибирует тРНК и более мелкие рРНК).

В случаях с РНК-полимеразами I и III формируются другие стабильные инициаторные комплексы.

Следует отметить, каким образом взаимодействие факторов транскрипции и ОИК регулирует инициацию транскрипции, сегодня еще не вполне ясно. Вероятно, здесь важна «гибкость» регуляции механизма экспрессии генов, ибо многие факторы транскрипции

вносят свой вклад в эту регуляцию при наличии на молекуле ДНК соответствующих участков их связывания (взаимодействия ДНК - белок).

В главе 2 сказано: экспрессия - главное свойство гена. Как продукт эволюции, процесс экспрессии имеет свои особенности.

Во-первых, для постоянной экспрессии нужна постоянная транскрипция мРНК. Причем, находящаяся в клетке молекула ДНК неизменно стабильна и готова к функционированию, тогда как образовавшаяся на одной из ее цепей молекула мРНК имеет период полужизни всего от 20 мин до нескольких часов, т.е. любой ген способен лишь к кратковременному производству полипептида.

Во-вторых, объем и скорость производства полипептидов зависят от числа рибосом в клетке и активности ферментов для биосинтеза белков.

В-третьих, в любой момент жизненного цикла клетки в состоянии экспрессии одновременно находятся не более 5-10% генов генотипа, тогда как остальные гены репрессированы.

Последнее объясняется одинаковым генотипом всех соматических клеток, и все без исключения гены этого генотипа могут экспрессироваться в любые полипептиды, необходимые для жизни клетки и организма в разные моменты их развития. Иными словами, все гены в хромосоме (ДНК, связанной с белками) находятся в «выключенном», репрессированном состоянии (вне транскрипции мРНК), поскольку нуклеосома блокирует область инициации транскрипции каждого промотора (см. главу 2). И до тех пор пока блок не снят (что позволило бы осуществить сборку ОИК), ген не будет транскрибироваться.

Экспрессия одной части генов клетки имеет постоянный характер (например, экспрессия генов «домашнего хозяйства»), тогда как экспрессия другой части генов имеет временный характер (например, экспрессия тканеспецифических генов).

Примерами генов «домашнего хозяйства» служат гены, кодирующие белки-ферменты, необходимые для синтеза ДНК, или гены, кодирующие ферменты гликолиза. Их экспрессия постоянно нужна любой клетке, кроме высокоспециализированных зрелых эритроцитов.

Примерами тканеспецифических генов служат гены, кодирующие белки клеток крови, печени, почек, мышц и т.д.

В-четвертых, если говорить о количественном участии генов в распределении белковых функций, то синтез РНК и белков контролируют 22% генов, внутриклеточный метаболизм - 17% генов, обеспечение механизмов деления, защиты, клеточных сигналов - по 12% генов (всего 36%), формирование клеточных структур - 8% генов; другие функции - 17% генов. Наибольшее число генов кодируют белки-ферменты (каждый третий ген - 31,2%). Существуют гены, кодирующие белки-модуляторы белковых функций, они стабилизируют, активируют или свертывают белки - их 13,6%.

Кроме перечисленных групп генов, выделены индуцибельные гены, экспрессия которых зависит от действия стероидных гормонов, и ряд других.

Как сказано выше, в активации экспрессии одного и того же или разных генов принимают участие разные факторы транскрипции. К ним относятся факторы, связывающиеся с ГЦ- и ЦААТ-боксами. Они расположены перед стартовой точкой транскрипции и присутствуют

во всех клетках. Причем каждый фактор транскрипции имеет два участка: один для связывания с ДНК, другой для связывания с белками, формирующими ОИК.

Дифференцированная экспрессия генов, очевидно, контролируется внутриклеточными и внеклеточными (организменными) факторами на основе программы онтогенеза, но как реально обстоит дело, пока неясно.

Вместе с тем в последние годы установлено: гены, кодирующие факторы транскрипции, избыточно представлены среди генов, обуславливающих развитие врожденных болезней. Например, более 30% таких генов связано с фенотипическим проявлением врожденных заболеваний (табл. 2).

Таблица 2. Фенотипическое проявление генов врожденных заболеваний

Название и локализация гена	Врожденное заболевание
MITF (3p12)	Синдром Ванденбурга, тип 2
KIT (4q12)	Неполный альбинизм
SHN (7q36), (7q32.3) и (2p21)	Голопрозэнцефалия
PTC (9q22)	Синдром Горлина
TBX5 (12q24)	Синдром Холта-Орама
LIGAM (Xq28)	Гидроцефалия
PAX (2p25.2) и (11p13.1)	Аниридия 1 и 2

Особенно высок удельный вес врожденных болезней, проявляющихся на первом году жизни ребенка, обусловленных мутациями в генах, кодирующих белки-ферменты (47%) и свидетельствующих о нарушениях гомеостаза в метаболизме таких детей (до их рождения метаболизм контролировался через плаценту и соответствовал материнскому гомеостазу).

Болезни, вызванные мутациями в генах, кодирующих белки-рецепторы, выявляются после первого года жизни на протяжении всего периода пубертата, а болезни, обусловленные мутациями в генах, кодирующих белки-модуляторы белковых функций, - в зрелом возрасте (до 50 лет).

Следует отметить, что механизм экспрессии генов длительное время считался соответствующим только формуле, предложенной Дж. Бидлом и Э. Тейтемом в 1941 г. («один ген - один фермент») и в дальнейшем преобразованной в формулу «один ген - одна полипептидная цепь». Эта формула длительное время считалась центральной догмой молекулярной биологии, однако затем произошло ее дополнение другими формулами, объясняющими механизмы экспрессии генов, и она перестала так называться.

Такое событие произошло в 1965 г., когда У. Дрейер и Дж. Беннет предложили для объяснения механизма биосинтеза иммуноглобулинов формулу «два гена - одна полипептидная цепь».

Оказалось, что в случае биосинтеза антител один ген отвечает за синтез вариабельной области иммуноглобулина (всего таких V-генов выделено 500), а другой ген отвечает за синтез константной области иммуноглобулина (как правило, либо единственный С-ген, либо резко ограниченное их число).

Благодаря указанному соотношению (500:1) рекомбинация (перегруппировка) наследственного материала в ходе образования лимфоцита происходит таким образом, что только один из всех V-генов создает информационный комплекс с С-геном в виде созревшей мРНК.

Спустя 30 лет Р. Дулиттл (1995) предположил: раз белковый домен - синтетаза жирных кислот - имеет только одну полипептидную цепь, но содержит в ней все необходимое для катализа семи реакций, значит, налицо общий результат действия семи разных генов. Тем самым была предложена еще одна формула: «семь генов - одна полипептидная цепь».

В результате выполнения международной программы «Геном человека» право на существование теперь имеют и такие формулы: «один ген - две, три или более полипептидные цепи», а также «разные участки одного гена - разные полипептидные цепи».

Например, мутации в разных частях онкогена RET обуславливают развитие четырех разных наследственных болезней: двух форм полиэндокринного аденоматоза (ZA - 10q21.2; ZB - 10q13), семейной медуллярной тиреоидной карциномы (10q21.2) и болезни Гиршпрунга (10q11).

Из вышесказанного следует вывод: независимо от того, один, два, семь генов или разные участки одного гена контролируют биосинтез одной или нескольких полипептидных цепей, конечным результатом их действия (взаимодействия) является образование многочисленных и сложно организованных полипептидов - носителей разных биологических функций на уровне клетки и организма.

Таким образом, данные о различной специфичности генной экспрессии не только расширили границы ранее существовавших представлений о непоколебимости центральной догмы молекулярной биологии, но и существенно их дополнили. Стала очевидной необходимость дальнейшего изучения характера связей между генами и полипептидами. Это касалось не только формулы, объясняющей механизм или путь от гена к полипептиду («обратная генетика»), но и формулы, объясняющей механизм альтернативного пути: от полипептида к гену («прямая генетика» и концепция клинической протеогеномики).

Говоря о механизмах альтернативного пути, предположим существование обратной связи или системы управления (контроля) за экспрессией генов со стороны продуцируемых ими белковых продуктов.

В частности, есть факт: биосинтез белков идет параллельно с экспрессией генов. Значит, должна поддерживаться тесная связь между указанными процессами.

Оказывается, такая связь действительно имеется: конкретные гены в ходе экспрессии создают конкретные белковые факторы (пептиды или полипептиды), контролирующие экспрессию самих же генов. Следовательно, экспрессия генов - неиссякаемый источник пептидов и полипептидов, возможности которого в пределах одного клеточного цикла безграничны по спектру полипептидов для всех генов генотипа, но ограничены числом рибосом, а также продолжительностью экспрессии и активностью ферментов, участвующих в биосинтезе полипептидов.

Возможности этого источника по спектру полипептидов в пределах жизни многоклеточного организма, вероятно, не имеют ограничений вообще, хотя в теоретическом плане они (возможности) должны зависеть от числа клеточных делений, контролируемых программой онтогенеза, - речь идет о числе *Хейфлика*, согласно

которому общее число делений одной клетки ограничено определенным пределом (см. главу 9).

БЕЛКИ КАК РЕЗУЛЬТАТ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ

Анализируя результаты работы генов, экспрессирующихся с образованием различных по своему назначению и функциям белков, приходишь к заключению: в живой природе нет ничего более удивительного, чем протеины (разумеется, после главной молекулы жизни - молекулы ДНК).

Как сказано в главе 1, протеины изучаются около 200 лет. Еще в начале XIX в. химики называли так определенные специфические вещества (от греческого «*proteios*» - «удерживающий первое место»). В России их нарекли белками в связи с белым цветом альбумина куриных яиц (один из самых распространенных протеинов) при его свертывании под влиянием высокой температуры.

Именно белкам принадлежит всеобъемлющая роль в молекулярной жизни клетки и организма, зависящей от производства и функционирования огромного числа белков. Их молекулы с невероятной точностью «узнают» другие молекулы (белковой и небелковой природы) и вступают во взаимодействие с ними в ходе онтогенеза.

Особое значение имеет полиморфизм белков, основанный на генетическом полиморфизме, в разных вариациях обуславливающим уникальную внутреннюю и внешнюю характеристику каждой клетки и целого организма. Тот же полиморфизм делает отдельные клетки и ткани, органы и даже целые системы многоклеточного организма более склонными к определенным болезням. Подобная склонность неизбежно прослеживается на уровне белков в виде их дефектов, возникших в ходе трансляции генетической информации, модификации белковых молекул и нарушений их взаимодействия при наследственных и врожденных заболеваниях.

Общая характеристика

Белки - главный строительный материал для клеток, тканей, органов и систем организма.

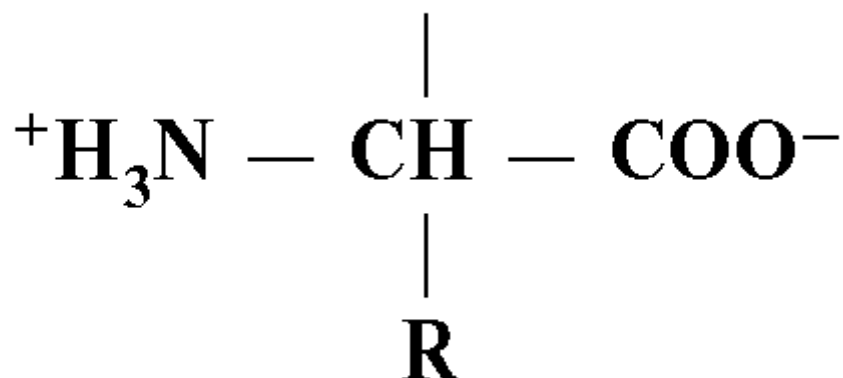
По теоретическим расчетам, организм человека состоит из 10^{15} клеток, формирующих 264 типа тканей, построенных из 350-400 тыс. белков, т.е. последних в 10 раз больше, чем генов, а с учетом модификаций общее количество белков в организме достигает 6 млн*.

Строение, свойства и спектр белковых молекул

Белковая молекула есть полипептидная цепь из аминокислотных остатков. Один такой остаток - одна аминокислота.

Все живые организмы используют для строительства своих белков одни и те же основные аминокислоты. Их всего 20, и только они кодируются с помощью классического генетического кода (см. главу 2).

Основные аминокислоты содержат в своей структуре *общий химический компонент*:



*

Максимально возможному количеству синтезируемых у человека белков соответствует принцип «*Cvantum satis*» (столько, сколько нужно).

Они отличаются друг от друга по *аминокислотным радикалам* (R). Каждая аминокислота имеет *полипептидный скелет* (или цепь без радикалов):

- NH - CH - CO - NH - CH - CO - NH - CH - CO -

Различия аминокислот по форме, размерам и полярности позволяют использовать их в качестве основных строительных единиц («кирпичей»), чтобы удовлетворить многочисленные и жесткие требования к структурной организации белков.

В коротких цепях белков менее 80 аминокислотных остатков (пептиды). В длинных цепях белков более 80 аминокислотных остатков (полипептиды).

Самая длинная из известных полипептидных цепей у человека содержит около 5000 аминокислотных остатков, однако большинство структурных белков содержат менее 2000 аминокислотных остатков.

Аминокислотный алфавит допускает существование бесконечного множества белковых молекул (слов).

Порядок расположения аминокислот в полипептидной цепи называется аминокислотной последовательностью - это первичная структура белка.

Процедура определения такой последовательности именуется сиквенированием (так же, как определение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК - см. главу 2).

Белок с природной укладкой полипептидной цепи - нативный белок. Белок с развернутой беспорядочной укладкой цепи - денатурированный белок. Денатурация - процесс превращения нативного белка в денатурированный.

Тепловая денатурация - общее свойство разных белков. Нагревание белка почти всегда нарушает его активность, и оно смертельно для клетки.

Каждый белок химически индивидуален (уникален) по своей первичной структуре - это основа гетерогенности белков.

Структурная (биохимическая) уникальность каждого белка обуславливает полиморфизм белков человека, его биохимическую индивидуальность.

Гетерогенность белков зависит также от активности белка (способности к денатурации), величины белкового пика, наличия антигенных детерминант и аминоконцевой последовательности.

Например, первичная структура коллагенов (см. ниже) представлена повторами аминокислотной последовательности типа глицин -

X-Y, в которых глицин является каждой третьей аминокислотой, позицию X занимает пролин, а позицию Y занимают, как правило, гидроксипролин или гидролизин.

Другие примеры - первичная структура мономера инсулина (рис. 15) и схема строения (рис. 16) молекулы инсулина (51 аминокислотный остаток).

Когда полипептидная цепь принимает в пространстве специфическую конфигурацию, то это вторичная структура белка (или собственно полипептидный скелет). Ее формируют 3 типа укладки: альфа-спираль, бета - складчатые слои и соединительные петли, распределенные вдоль полипептидной цепи.

Дальнейшая пространственная укладка полипептидной цепи называется третичной (трехмерной) структурой белка.

К белкам с трехмерной структурой относится большинство белков: белки клеточных мембран, цитохромы (содержат гем в качестве простетической группы), дегидрогеназы (содержат флавинадениндинуклеотид - FAD), гликопротеины (связаны с углеводными компонентами), протеоглики (формируют межклеточный матрикс), белки плазматических мембран, секреторные белки, белки сыворотки крови, белки муцина (слизи) и т.д.

Причем трехмерная структура характерна как для *глобулярных белков* (компактное сферическое образование в виде глобул со слабыми

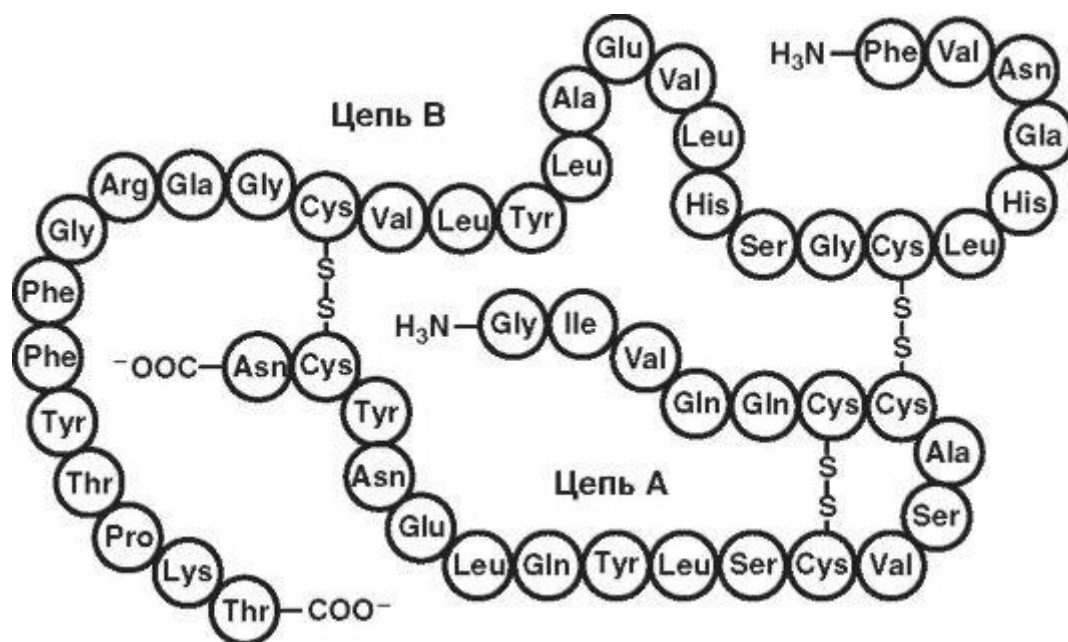


Рис. 15. Первичная структура мономера инсулина (по Сэнджер Ф., 1954; <http://www.transplantology.com/index.php.&page39>)



16. Схема строения молекулы инсулина (по: [www.xumuk.ru; http://www.xumuk.ru/biologhiim/22.html](http://www.xumuk.ru/biologhiim/22.html)). Между цепями АиВи внутри А-цепи образуются дисульфидные (-S-S-) связи. Близкими по первичной структуре оказались инсулины человека, свиньи и кашалота. Единственным отличием инсулина человека от инсулинов других видов является нахождение треонина в положении 30 В-цепи вместо аланина (пептидными связями), так и *фибрилярных белков*, имеющих длинные вытянутые вдоль общей оси полипептидные цепи с прочными непептидными связями.

Наиболее наглядными примерами фибриллярных белков служат коллагеновые белки, из которых состоят соединительная ткань и сухожилия, а также белки на основе альфа-кератина (волосы и ногти) или эластина (клетки кожи и стенок артерий и легочных альвеол).

Коллагены - филогенетически наиболее старые белки, с них начиналась органическая жизнь на Земле.

В настоящее время в геноме человека идентифицировано более 40 коллагеновых генов и еще столько же участков ДНК, содержащих характерные для коллагеновых генов последовательности нуклеотидов разной протяженности.

Всего описано 28 типов коллагенов. Их молекулы включают три полипептидные альфа-цепи, соединенные в уникальную конформацию - тройную спираль.

На рис. 17 приведена схема синтеза коллагеновых белков: в шероховатом ретикулуме цитоплазмы пре-преколлагеновая цепь преобразуется (благодаря отщеплению сигнального пептида) в проколлагеновую альфа-цепь (в таком виде она представлена в аппарате Гольджи).

Затем альфа-цепь подвергается воздействию ферментов секреторных вакуолей, обеспечивающих процессы ее гидроксирования, гликозилирования и образования дисульфидных связей. Потом три альфа-цепи превращаются в проколлагеновую молекулу, поступающую в экстраклеточный матрикс, где от нее отщепляются пропептиды, и она становится коллагеновой молекулой.

XIY).

Агрегаты молекул фибриллярных коллагенов следующие: димеры, димеры-тетрамеры, тетрамер «паук», нитеподобные филаменты, якорные фибриллы и др.

Существуют также белки с макромолекулами, представленными функционально активными комплексами, состоящими из нескольких полипептидов. Это *субъединицы олигомерного (протомерного) белка*. Укладку субъединиц в таком белке называют четвертичной (четырёхмерной) структурой, или пространственным расположением взаимодействующих между собой субъединиц, образованных отдельными полипептидными цепочками.

Такая структура характерна для белков, построенных из двух или более полипептидных цепей. Это способ укладки протомеров в пространстве. Причем протомеры связаны друг с другом посредством нековалентных связей (ионных, водородных, гидрофобных) и взаимодействуют между собой только определенными участками поверхности (www.biochemistry.ru). Например, эритроциты содержат гемоглобин - белок, образованный четырьмя цепями аминокислот. Каждая цепь присоединяется к молекулярной группе (группа гема) с один атомом железа, фиксирующим молекулу кислорода и переносящим ее от легких к тканям, а диоксид углерода - от тканей к легким. Так реализуется элементарное проявление жизни, называемое молекулярным дыханием. И хотя на первый взгляд его механизм выглядит простым, он основан на взаимодействии многих типов атомов в гигантской молекуле гемоглобина.

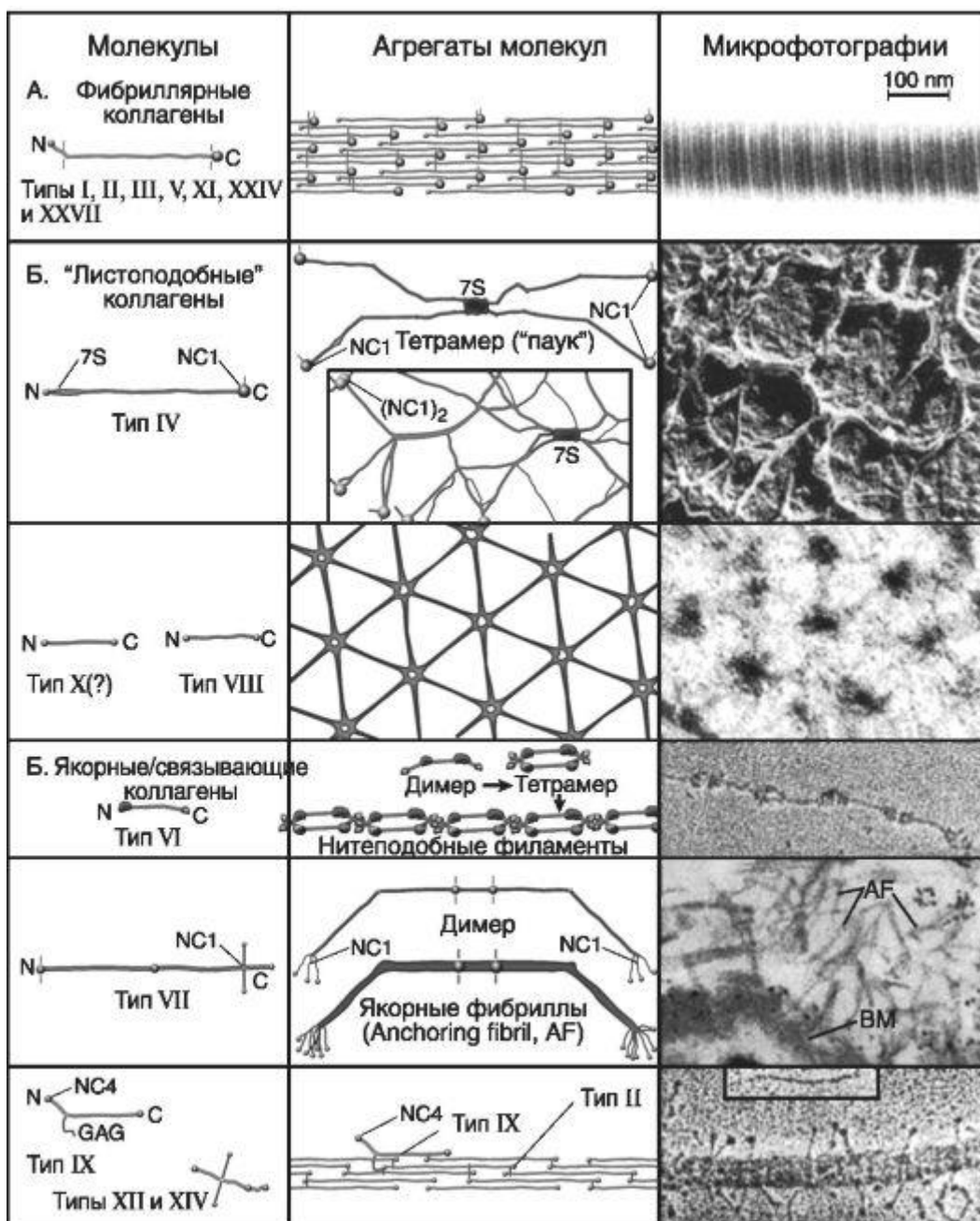


Рис.

18. Супрамолекулярная структура фибриллярных коллагенов (по: М.А. Курниковой, 2007)

Подсчитано: в одном эритроците содержится около 340 млн молекул гемоглобина. Каждая из них состоит из 10^3 атомов, относящихся к С, Н, О, N, S и Fe (последний элемент представляют 4 атома). Атомы железа расположены в центре гема - пигмента, придающего крови характерный красный цвет. Каждая из четырех молекул гема «обернута» одной полипептидной цепью (рис. 19).

В молекуле гемоглобина взрослого человека НbА (от англ. adult) находятся четыре полипептидные цепи, вместе составляющие белковую часть (или глобин). Две из них, называемые α -цепями, имеют одинаковую первичную структуру и содержат по 141 аминокислотному остатку. Две другие, обозначаемые β -цепями, также идентично построены и содержат по 146 аминокислотных остатков.

Таким образом, вся молекула глобина состоит из 574 аминокислот. Во многих положениях в α - и β -цепях гемоглобина разные аминокислотные последовательности при почти одинаковых пространственных структурах.

Получены доказательства, что у 20 видов животных в структуре гемоглобинов 9 аминокислот оказались одинаковыми в своей последовательности и консервативными (инвариантными), определяющими функции гемоглобинов; некоторые из них находятся вблизи гема, в составе участка связывания с кислородом, другие - в составе неполярной внутренней структуры глобулы.

На рис. 19 приведена четырехмерная структура гемоглобина.

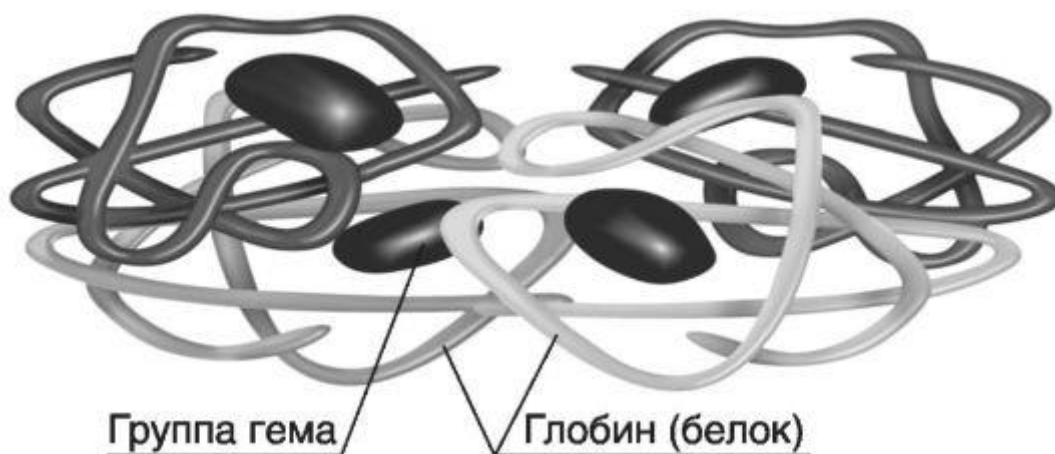


Рис.

19. Четырехмерная структура гемоглобина (по <http://www.rusmedserver.ru//med/anatome/sistkrovi/19.html>). Гемоглобин в качестве белкового компонента содержит глобин, а небелкового - гем. Видовые различия гемоглобина обусловлены глобином, в то время как гем одинаков для всех видов гемоглобина

Наряду с белками, обладающими указанными выше структурными особенностями (способы укладки), выделены белки-домены (или белковые модули), представляющие собой фрагменты полипептидной цепи, сходные по свойствам с глобулярными белками.

Домены автономны, но подчинены общему биологическому смыслу, что позволяет представить их как совокупность отдельных элементарных процессов.

Идея модульной конструкции белков-ферментов допускает частое появление и быструю эволюцию новых функциональных белков по принципу сборки электронного устройства из микросхем.

Иногда белки-домены кодируются отдельными фрагментами генов - экзонами. Значит, не исключена перетасовка экзонов (и соответственно доменов) как механизм эволюции белков.

Концепция модульного фолдинга

Рассмотрим ситуацию, возникающую в клетке после синтеза полипептида. Он «пробует» самостоятельно преобразоваться в трехмерную структуру за счет взаимодействия аминокислотных остатков. Известно, что возможности ассоциации аминокислотных остатков друг с другом безграничны.

Именно этот беспорядочный и безграничный процесс назван фолдингом.

Ответ на вопрос о том, какая именно трехмерная структура белка возможна после синтеза полипептидной цепи, известен: это определяется аминокислотной последовательностью. Однако сама последовательность не позволяет ответить на другой вопрос: каким образом

такая структура может возникнуть? Иными словами, это одна из нерешенных проблем молекулярной биологии.

Процесс фолдинга происходит с участием двух классов белков: белков-ферментов и белков - молекулярных шаперонов.

К первому классу белков относятся два белка-фермента. Один из них - протеиндисульфидизомераза (ПДИ), образующая, перемещающая или разрушающая в самой полипептидной цепи связи -S-S- между остатками цистеина и тем самым корректирующая фолдинг (в эндоплазматическом ретикулуме клетки). Второй белок - пептидилпролизиомераза (ППИ) - катализирует цис- и трансизомеризацию пептидных связей пролина, обеспечивая правильную конфигурацию белка. Например, к таким белкам относятся циклофиллины.

Они связывают циклоспорин (антибиотик и иммунодепрессант) при трансплантации органов.

Молекулярные шапероны включают семейство высокоспециализированных белков, находящихся в правильной пространственной структуре для вновь синтезированных белков. Их название происходит от слова «шаперон» (буквально - пожилая дама, сопровождающая молодую девушку на балах).

Шапероны связываются с ошибочными структурами белка, что стабилизирует частично свернутую молекулу до того момента, пока не произойдет правильный фолдинг (после отхода шаперона).

Таким образом, шапероны стабилизируют неустойчивую форму и способствуют образованию правильной формы полипептида в ходе различных молекулярных процессов: олигомерной сборки или транспорта белка, самого фолдинга, а также контроля за «переключением» конформации белка (активная - неактивная, нормальная - патологическая). В последнем случае такими примерами служат переключения, происходящие в специфических рецепторах для глюкокортикоидов и в ходе преобразования нормальной изоформы в патологическую изоформу для прионных белков (см. главу 29).

Классы белков и их функции

Многие известные классификации белков основаны на случайных показателях (физико-химические свойства, форма молекул, локализация и происхождение, аминокислотный состав), а также на особенностях структуры и функционирования протеинов. Большинство подобных классификаций не соответствует постоянно возрастающему уровню знаний о белках.

В частности, расшифрованы структура и функции только нескольких сотен природных белков, а их около 6 млн модификаций. Стройная система номенклатуры белков и их подразделение на типы отсутствуют, из-за чего ряд авторов ограничиваются разделением белков человека на два класса: структурные и функциональные протеины (белки-ферменты).

В первую очередь рассмотрим самую старую классификацию белков, основанную на определенных (не вполне значимых) данных об их структуре, составе и свойствах. Согласно этой классификации, белки делятся в зависимости от химического состава на простые и сложные.

Простые белки построены из остатков аминокислот и при гидролизе распадаются только на свободные аминокислоты. Различают

подгруппы простых белков: альбумины, гистоны, глютелины, глобулины, проламины, протамины и др.

Сложные белки двухкомпонентны, состоят из простого белка и небелкового компонента, называемого *простетической группой*. При гидролизе сложных белков, помимо свободных аминокислот, освобождается небелковая часть или продукты ее распада.

Классификация сложных белков основана на химической природе входящего в их состав небелкового компонента, в соответствии с чем различают гликопротеины (содержат углеводы), липопротеины (содержат липиды), металлопротеины (содержат металлы), нуклеопротеины (содержат нуклеиновые кислоты), фосфопротеины (содержат фосфорную кислоту) и хромопротеины (содержат пигменты).

В более сложной классификации белков учитываются особенности их структуры. Различают α -, β -, $\alpha\beta$ - или α/β -белки.

Причем α -белки содержат только α -спирали (не менее 60%); β -белки - только β -спирали; $\alpha\beta$ -белки и α/β -белки - и те, и другие структуры в пределах одной полипептидной цепи (например, молекулы лизоцима). Так, в α/β -белках множество α - и β -структур, чередующихся вдоль полипептидной цепи или так называемых доменов, создаваемых объединением α -спиралей и β -слоев, между которыми открываются более рыхлые структуры.

В качестве примеров белков, классифицируемых по структурному принципу, выше рассмотрены: инсулин (см. рис. 15, 16), коллагены (см. рис. 17, 18) и гемоглобин (см. рис. 19).

Вместе с тем наиболее распространенная классификация белков - их разделение по функциональному принципу. Выделен класс протеинов, обладающих способностью катализировать химические реакции, разработана стройная система их номенклатуры, учитывающая химическую природу и типы белков. Однако этот класс белков охватывает лишь незначительную их долю, не более 3000.

По функциональному принципу выделяют 12 основных классов белков: каталитически активные белки-ферменты; белки-гормоны (в том числе стероидные гормоны); белки-регуляторы активности генома; защитные белки (антитела) и белки свертывающей и антисвертывающей систем крови; токсические белки; транспортные белки; мембранные белки; сократительные белки; рецепторные белки; белки-ингибиторы ферментов; белки вирусной оболочки; белки с иными функциями (например, прионные белки).

Прионные белки

В последние годы в клинической генетике выделен класс нейродегенеративных заболеваний, связанных с прионными белками. Они устойчивы к действию протеаз и обнаружены в мозге человека и животных как в нормальной, так и в патологической формах, представляющих собой две изоформы одного и того же полипептида, кодируемые одним и тем же геном.

Однако их конформация различна: патологический белок имеет высокое содержание бета-слоев, тогда как нормальный белок их почти не имеет.

Кроме того, патологический белок сам себя воспроизводит, что позволяет ему выступать в роли возбудителя прионной болезни (см. главу 29).

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ПРОТЕОМИКИ

Сначала рассмотрим общие положения, связанные с появлением основных понятий протеомики. Среди главных факторов, принимающих участие в формировании белковых продуктов онтогенеза - носителей разнообразных функций клетки и организма (отдельных признаков и фенотипа в целом), выделены 3 группы:

- гены и генотип (см. главу 2);
- механизмы взаимодействия между материнским и отцовским геномами (см. главу 4);
- факторы окружающей среды (см. главы 4 и 5).

Для упрощенного рассмотрения действия этих факторов при формировании признаков и фенотипа в середине XX в. предложено основное уравнение: $P = G + E$, в котором P - это признак (фенотип), G - ген (генотип), E - фактор(ы) среды.

Следовательно, признак (фенотип) охарактеризован как результат действия гена (генотипа), фактора среды или их совместного влияния (общий эффект).

Иными словами, P - это регистрируемый результат (внутренний и/или внешний) действия (функции) генов и факторов среды, их фенотипическое проявление.

Таким образом, за любым признаком (фенотипом) стоит функция конкретного гена (генотипа) и/или эффект фактора(ов) среды.

С позиций протеомики, признак (фенотип) - это результат экспрессии гена, проявляющийся в виде структурного или регуляторного белка (белка-фермента) или их комплексов.

Теперь сформулируем основные понятия протеомики.

Признак, нормальный признак, патологический признак

Признак - это фенотипическое проявление или результат действия гена(ов), фактора(ов) среды или их совместного действия.

Другое определение признака: это дискретная единица, характеризующая конкретный уровень организма (молекулярный, биохимический, клеточный, тканевый, органный или системный); она отличает один организм от другого.

Разные организмы (в пределах одного биологического вида) имеют разные признаки (окраска глаз, курчавость волос, длина и масса тела и т.п.).

К признакам клетки и организма, проявляющимся на молекулярном (генетическом и биохимическом) уровне, или молекулярным признакам, относятся так называемые строительные материалы клеток и тканей, органов и систем, т.е. макромолекулы и микромолекулы органических соединений со встроенными в них неорганическими веществами. Главные из таких молекул - нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды и нуклеотиды), белки (полипептиды, пептиды и аминокислоты), полисахариды и моносахариды, липиды и их компоненты.

К надмолекулярным (супрамолекулярным) признакам, проявляющимся на клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях, относятся: антропометрические, анатомические, морфологические (гистологические), физиологические (функциональные), неврологические, эндокринологические, иммунологические, психические, психологические и другие фенотипические особенности организма.

Признаки делятся на нормальные и патологические.

Нормальный признак - это фенотипическое проявление определенного признака в пределах установленных для него границ нормы, результат нормального действия гена, фактора окружающей среды или их совместного влияния.

Например, нормальное количество лейкоцитов в крови ребенка - 6-9 тыс.

Патологический признак - это фенотипическое проявление определенного признака, выходящее за пределы установленных для него границ нормы, либо это проявление ранее неизвестного (нового) признака.

Например, если в крови у ребенка меньше 6 тыс. лейкоцитов - это лейкопения, а больше 9 тыс. - это лейкоцитоз.

Патологический признак как симптом болезни - это результат патологического действия гена, фактора окружающей среды или их совместного влияния.

Фенотип, нормальный фенотип, патологический фенотип

Фенотип - это совокупность всех признаков организма, обусловленных совместным действием генотипа и факторов среды.

Нормальный фенотип - это совокупность всех нормальных признаков организма, обусловленных нормальным действием генотипа и факторов среды (результат их взаимодействия).

Патологический фенотип - это наличие ряда патологических признаков организма, обусловленных патологическим действием генотипа и факторов среды (результат их взаимодействия), на фоне других нормальных признаков организма.

Здесь следует пояснить смысл формулировки «...на фоне других нормальных признаков».

Если у больного человека выявлен конкретный патологический признак или фенотип (например, симптоматика ОРВИ), то это совсем не означает, что у него исчезли другие (нормальные) признаки, например голубая окраска глаз, курчавость волос и др.

Патологический фенотип как симптомокомплекс болезни - это результат совместного патологического действия генотипа и факторов окружающей среды.

Фенотипический полиморфизм

Фенотипический полиморфизм - это многообразие нормальных и патологических признаков и фенотипов, выявляемых на любых уровнях дискретности организма: молекулярном, клеточном, тканевом, органном и организменном.

С фенотипическим полиморфизмом тесно связаны:

- полиморфизм последовательностей ДНК или генетический полиморфизм (см. главу 2), служащий основой генетической уникальности (индивидуальности) человека;
- полиморфизм белков, или протеомный (биохимический) полиморфизм (см. выше), служащий основой фенотипической уникальности (индивидуальности) человека.

Понятия клинической протеомики

Клиническая протеомика - это патологические (клинические) признаки и фенотипы, с которыми имеет дело врач любой специальности, проводящий осмотр пациентов.

К клиническим признакам и фенотипам относятся:

- симптом болезни (см. «патологический признак»);
- симптомокомплекс болезни (см. «патологический фенотип»);
- болезнь, патокинез и прогредиентность.

Болезнь - это патологический процесс, возникший в ходе онтогенеза, это временный или постоянный патологический фенотип (симптомокомплекс болезни), характеризующийся патокинезом и прогредиентностью.

Понятия «патокинез» и «прогредиентность» впервые введены И.В. Давыдовским (1961).

Патокинез - это движение патологического процесса, т.е. болезнь движется от начала до конца, последовательно проходя стадии продромы (скрытый, или латентный период), манифестации первых признаков, течения болезни (начало, совпадающее с манифестацией, середина течения и исход). Исход - это выздоровление, переход болезни в хроническое состояние или смерть.

Прогредиентность - это прогрессирование патологического процесса или нарастание степени тяжести (экспрессивности) болезни по мере ее течения.

Наследственная болезнь

Наследственная болезнь - это возникший в ходе онтогенеза постоянный (конституциональный) патологический фенотип с признаками патокинеза и прогредиентности, передаваемый из поколения в поколение.

Врожденная болезнь

Врожденная болезнь - это возникший внутриутробно постоянный патологический фенотип без признаков патокинеза и прогредиентности, передаваемый или не передаваемый из поколения в поколение, что связано с генетической или негенетической причиной болезни.

Например, если диагноз синдрома Дауна поставлен уже при рождении ребенка, то фенотип такого больного остается стабильным в течение всей его жизни, ибо он обусловлен хромосомным нарушением.

Хромосомный синдром

Хромосомный синдром - это вариант врожденной болезни, вызванный генетической причиной (структурной или геномной мутацией), но, как правило, не наследуемой, за исключением случаев сбалансированных семейных транслокаций (см. главу 17).

Клинический синдром

Понятие «клинический синдром» созвучно понятию «хромосомный синдром», но отнюдь не совпадает с ним.

Клинический синдром характеризует наиболее выраженные клинические особенности отдельного заболевания (их группы) или отдельные периоды болезни. Таких синдромов насчитывается несколько десятков. В качестве примеров следует привести:

- респираторный нейродистресс-синдром - вариант начала гликогенозов разных типов (см. главу 21);

- синдром дыхательной недостаточности - развивается у новорожденного из-за незавершившейся дифференцировки альвеолярного эпителия и слабой выработки сурфактанта (см. главу 14);
- синдром «внезапной смерти» («смерти в колыбели») - вариант исходов гликогеноза Помпе и адреналового криза при сольтеряющей форме АГС (см. главы 14,17 и 21);
- синдром мальабсорбции или нарушенного кишечного всасывания - одна из характерных особенностей многих наследственных болезней обмена (см. главу 21);
- синдром гормонального криза (см. главу 14);
- синдром нечувствительности к андрогенам (см. главу 16);
- талидомидный синдром (см. главу 23).

Синдром как понятие тератологии

В тератологии (дисморфологии) понятие «синдром» обозначает устойчивое сочетание двух или более пороков развития, выявляемых в разных системах организма и патогенетически связанных между собой (см. главу 23). В основе такого синдрома лежит одна причина, которая может быть обусловлена генной мутацией, хромосомной aberrацией или действием тератогена.

Врожденный порок развития

Врожденный порок развития (ВПР) или большая аномалия развития (БАР) - стабильный патологический признак, регистрируемый как морфологическое изменение органа (большого участка тела), выходящее за пределы вариаций границ строения (за границы нормы) и сопровождающееся нарушением функции, т.е. стойкое морфофункциональное нарушение.

В зависимости от этиологической причины ВПР (БАР) либо передается из поколения в поколение, либо нет. В первом случае это

ВПР, обусловленные доминантно и рецессивно наследуемыми генными мутациями, пороками мультифакториальной природы, а также семейными транслокациями. Во втором случае это пороки экзогенного происхождения.

Малая аномалия развития

Малая аномалия развития (МАР) - это, как правило, стабильный патологический признак или изменение органа (участка тела) на конечной стадии морфогенеза (стадии гистогенеза), не выходящее за пределы вариаций границ строения и не сопровождающееся нарушением функции, т.е. стойкое (в большинстве случаев) гистологическое нарушение.

В зависимости от этиологической причины МАР могут передаваться или не передаваться из поколения в поколение, а в ряде случаев изменяться с возрастом вплоть до полного исчезновения (см. главу 23).

Клинический полиморфизм, уровни его проявления и признаки

Клинический полиморфизм как понятие клинической протеомики подразумевает различия в клинической картине одного и того же заболевания у разных больных, т.е. несовпадение отдельных симптомов (симптомокомплексов).

Известно, что в древности и особенно в средние века врачи отличались глубокими знаниями анатомии на тканевом, органном и системном уровнях организма.

Медики XVIII-XIX вв. изучали человека уже на клеточном уровне; стали востребованы гистология, биохимия, физиология, патологическая анатомия и физиология, микробиология. В XX в. приобрели актуальность вирусология, аллергология, иммунология, общая и медицинская генетика, молекулярная биология и генетика, биофизика, физико-химическая медицина; во второй половине века начались исследования на молекулярном уровне.

Современная молекулярная медицина основана на знаниях геномики, протеомики и биоинформатики. Начался переход на атомный, субатомный (атомолярный) уровни, наноуровень (см. главу 20).

Причем, если раньше медицина прогрессировала медленно, веками, то в современных условиях появление и внедрение нового происходит значительно быстрее - в течение нескольких десятилетий.

Параллельно с развитием медицины усложнялась проблема клинического полиморфизма патологических признаков и фенотипов. Как сказано выше, клинический полиморфизм обусловлен действием генов в составе генотипа организма (взаимодействием материнского и отцовского геномов) с участием или без участия факторов окружающей среды. В отличие от генетического и биохимического полиморфизмов, определяемых на молекулярном уровне, клинический полиморфизм проявляется на тканевом, органном и системном уровнях, в связи с чем врач самостоятельно оценивает патологические признаки и фенотипы в ходе осмотра пациентов, применяя доступные только ему общие клинические, клинико-инструментальные и клинико-лабораторные методы обследования больных с наследственной и ненаследственной патологией (см. главу 18).

Кроме того, если врач осматривает в конкретной семье помимо самого больного еще его родственников, страдающих тем же заболеванием, то имеет место следующий уровень клинического полиморфизма - уровень внутрисемейных различий.

Если же врач осматривает разных больных с одним заболеванием в неродственных семьях, то имеет место еще один уровень клинического полиморфизма - уровень межсемейных различий.

Таким образом, всего выделяют 5 уровней клинического проявления патологических признаков и фенотипов: тканевый, органный, организменный, внутри- и межсемейный.

К признакам клинического полиморфизма, выявляемым на всех уровнях, относятся: антропометрические, анатомические, морфологические (гистологические), физиологические (функциональные), неврологические, эндокринологические, иммунологические, психические, психологические и другие особенности организма, фиксируемые самим врачом при осмотре (обследовании) больного.

Таким образом, понятие «клинический полиморфизм» по спектру признаков и фенотипов значительно уже (только патология), чем понятие «фенотипический полиморфизм» (и норма, и патология). В свою очередь, и методов исследования проблемы клинического полиморфизма пока известно значительно меньше (см. главу 18), чем методов для изучения проблемы фенотипического полиморфизма (см. главу 19).

Вместе с тем, в условиях современной молекулярной медицины у врачей не должно быть никаких сомнений в отношении будущего существенного расширения спектра молекулярных и субмолекулярных методов изучения клинического полиморфизма.

ГЛАВА 4 НАСЛЕДОВАНИЕ ГЕНОВ И ПРИЗНАКОВ

Общие данные

Результаты взаимодействия генов двух родительских геномов в зиготе и развившемся из нее многоклеточном организме проявляются в контролируемых ими признаках, которые в той или иной мере передаются из поколения в поколение. Такое наследование зависит от многих причин.

В классической генетике длительное время считалось, что вклад обоих родителей в геном потомства примерно одинаковый как по материнской, так и по отцовской линии семейных родословных. На этой основе сформулировали одно из первых правил наследования - равнозначность и взаимосвязанность функций двух разных по происхождению аллелей одних и тех же генов (или *эквивалентность реципрочных скрещиваний*). Выделили два варианта и ряд типов наследования с учетом количества генов, их происхождения (материнское или отцовское), локализации в аллельных или неаллельных локусах аутосом и половых хромосом, характера проявления (доминантность или рецессивность), а также особенностей (механизмов) взаимодействия между генами.

Однако уже во второй половине XX в. установили: во многих случаях вклад одного из родителей значительно отличается от вклада другого родителя. Было показано: функции родительских генов на протяжении всего онтогенеза могут изменяться вплоть до дифференциального отключения материнских либо отцовских аллелей. В основе этого явления лежит эпигеномный процесс или маркирование локусов хромосом одного из родителей, приводящее к выключению экспрессии расположенных в них аллелей. Данное явление получило название импринтинга. Термин впервые применен во втором десятилетии XX в. австрийским зоологом Конрадом Лоренцом. Наблюдая за поведением утят, только что вылупившихся из яичной скорлупы, он обратил внимание: они ищут взглядом свою маму-утку. Если в поле их зрения попадает хозяин или хозяйка утки либо пробегающая мимо собака или кошка - за ними, как за своей матерью, утята следуют всю дальнейшую жизнь.

Таким образом, речь идет о формировании до рождения ряда функций организма, запечатленных в геноме («геномная память»).

Позднее термин «импринтинг» стали применять невропатологи. Импринтингом, считают они, обусловлено происхождение ряда врожденных феноменов у новорожденных младенцев, например таких, как поиск соска материнской грудной железы или базисные функции (глотание, дыхание, жевание, кровообращение, пищеварение и сосание), которые сформировались во внутриутробной жизни.

Затем этот термин стали использовать генетики для объяснения необычного поведения половых хромосом (элиминация хромосом отцовского происхождения) у насекомых рода *Sciara Coprophila* (Кроуз Г., 1960). Было показано: отцовские X-хромосомы каким-то образом маркируются (импринтируются) перед слиянием гамет в соответствии со своим родительским происхождением.

В настоящее время убедительно доказано общебиологическое значение импринтинга как эпигеномного процесса, связанного с регуляторными (функциональными) изменениями активности генома и не связанного с его структурными повреждениями (см. главу 28).

У человека в результате импринтинга, например, экспрессируется материнский ген (аллель), тогда как отцовский аллель блокируется или наоборот. Следовательно, у индивида имеет место только моноаллельная экспрессия или неэквивалентный вклад в

геном одного из его родителей, а значит, налицо отклонение от менделевских законов наследования, основанных на диаллельной модели (см. главу 2).

Прежде чем рассмотреть такие отклонения, остановимся на закономерностях наследования генов и признаков, впервые описанных Г. Менделем на основе результатов его экспериментов по скрещиванию семян садового гороха. В дальнейшем эти закономерности стали называть законами наследственности и распространили на человека.

Законы наследственности

В современной редакции законы наследственности формулируются следующим образом.

- Первый закон - закон доминирования (или единообразия) признака у потомков первого поколения. В первом поколении у потомка проявляется действие доминантного гена (доминантный

признак), но не проявляется действие рецессивного гена (рецессивный признак). В последующих поколениях у потомка проявляется действие как доминантного, так и рецессивного гена.

- Второй закон - закон расщепления генов у потомка или закон «чистоты гамет». У потомка происходит альтернативное расщепление (распределение) генов в гаметах: одна половина гамет несет доминантные гены (А), а другая половина - рецессивные гены (а). Оба типа генов присутствуют в соматических клетках, не смешиваясь и не заменяя друг друга.

- Третий закон - закон независимого наследования неаллельных генов или случайных сочетаний наследственных задатков у потомков. Наследование двух генов (двух пар признаков) называется *дигибридным*, более двух генов (двух пар признаков) - *полигибридным*. Формула такого наследования соответствует биномиальному ряду: $(3 + 1)^n$, где n - число генов (пар признаков). Для выведения формулы используется решетка Р. Пеннета. С ее помощью рассчитываются генотипы организмов, их количество и зависимость от типов гамет, содержащих доминантные и рецессивные гены (табл. 3).

Таблица 3. Решетка Р. Пеннета

Первый родитель	Второй родитель			
	A	a	B	b
A'	A'A	A'a	A'B	A'b
a'	a'A	a'a	a'B	a'b
B'	B'A	B'a	B'B	B'b
b'	b'A	b'a	b'B	b'b

Примечание. А, В, А' и В' - доминантные гены; а, b, а'и b' - рецессивные гены; А'А, В'В, А'В и В'А - доминантные гомозиготные организмы; а'а, а'Ь, Ь'а, b'b - рецессивные гомозиготные организмы; А'а, а'Ь, а'А, а'В, В'а, В'Ь, Ь'а и Ь'В - доминантные гетерозиготные организмы.

Помимо трех законов наследственности, наследование генов и признаков определяют основные положения хромосомной теории наследственности.

Хромосомная теория наследственности

Во втором десятилетии XX в. Томас Хент Морган (1866-1945) и его ученики (К. Бриджес, Г. Меллер и А. Стертевант) сформулировали основные положения хромосомной теории наследственности (все

авторы стали нобелевскими лауреатами). С тех пор их формулировки почти не изменились, хотя некоторые уточнения и были сделаны.

Хромосомная теория наследственности в современной редакции включает следующие положения.

- Гены расположены в хромосомах; число генов в хромосоме пропорционально длине хромосомы. В дальнейшем оказалось: разные гены различны по длине, поэтому не всегда соблюдается указанная пропорция. Например, на хромосомах 5 и 9 генов идентифицировано больше, чем на самых длинных хромосомах 1 и 2.
- Гены расположены по длине хромосомы в линейном порядке. В дальнейшем выделили мобильные генетические элементы или «прыгающие гены» (транспозоны), которые перемещаются по геному с одной хромосомы на другую, нарушая линейный порядок расположения.
- Аллельные гены занимают идентичные локусы гомологичных хромосом. Из двух гомологичных хромосом по происхождению одна - отцовская, другая - материнская. Их локусы идентичны друг другу. В них находятся аллели одного и того же гена или аллельные гены. Каждый из двух аллелей одного и того же гена представляет собой отцовскую и материнскую копии; в норме это, как правило, диаллельная модель организационной структуры гена (см. рис. 12). В случае наследственной патологии у индивида может быть только один генный локус, и соответственно в нем будет находиться один аллель (либо отцовский, либо материнский); это состояние моноаллельности по данному аллелю отмечается, например, при синдроме Шерешевского-Тернера (кариотип: 45,ХО). Другой патологический вариант - наличие у индивида одновременно трех аллелей и более; это состояние полиаллельности по данному аллелю - например, три идентичных аллеля одного и того же гена трех хромосом 21 при синдроме Дауна (кариотип: 47,XX,+21); три аллеля трех хромосом 13 при синдроме Патау (кариотип: 47, XY+13) либо наличие в кариотипе от 4 до 11 X-хромосом (4-11 аллелей одного и того же гена - 49, XXXX).
- Гены одной хромосомы образуют группу сцепления, обеспечивая совместное наследование контролируемых ими признаков. Следует отметить: сцепление генов с хромосомой постоянно нарушается в ходе кроссинговера - процесса гомологичной рекомбинации или обмена одинаковыми участками (генами и их фраг-

ментами) между гомологичными хромосомами в первом делении мейоза. Частота кроссинговера прямо пропорциональна расстоянию между генами. Взаимный обмен аллелями отцовского и материнского происхождения происходит между всеми парами гомологичных хромосом, за исключением X- и Y-хромосом. Открытие кроссинговера также принадлежит школе Т.Х. Моргана. Теперь рассмотрим варианты и типы наследования генов и признаков.

ВАРИАНТЫ И ТИПЫ НАСЛЕДОВАНИЯ ГЕНОВ И ПРИЗНАКОВ

В настоящее время выделяют три варианта наследования генов и признаков: моногенный и полигенный при традиционном (классическом) наследовании и вариант неклассического или нетрадиционного наследования.

Моногенное наследование основано на первом и втором законах наследственности. Оно подразумевает наследование одного гена (одной пары признаков) и относится к аллельным генам.

Полигенное наследование основано на третьем законе наследственности. Оно подразумевает наследование двух генов (пар признаков) и более и относится к неаллельным генам.

Нетрадиционное наследование есть наследование генов и признаков, выходящее за рамки моногенного и полигенного вариантов.

Моногенное наследование

Моногенное наследование нередко называют простым менделевским наследованием.

На основе представлений о диаллельной модели структуры гена наследование механизмов взаимодействия между отцовским и материнским геномами рассматривается отдельно для каждой аллельной и неаллельной пары.

Типы моногенного наследования

В рамках моногенного наследования выделяют:

- аутосомно-доминантный тип (на одной из двух аутосом расположен доминантный ген);
- аутосомно-рецессивный тип (на одной из двух аутосом расположен рецессивный ген);
- X-сцепленный доминантный тип (на X-хромосоме расположен доминантный ген);
- X-сцепленный рецессивный тип (на X-хромосоме расположен рецессивный ген);
- Y-сцепленный тип или голандрическое наследование (ген расположен на Y-хромосоме).

Согласно каталогу В. Маккьюсика «Наследование менделевских признаков у человека» (Интернет-версия: online - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>), идентифицировано более 12,5 тыс. таких фенотипов. Среди них около 12 тыс. - фенотипы, наследуемые (или предположительно наследуемые) аутосомно-доминантно или аутосомно-рецессивно (в том числе 9 тыс. фенотипов с установленным типом наследования).

В последние годы получен ряд данных о наследовании, сцепленном с X- и Y-хромосомами, на которых локализованы соответственно

300 и 92 гена.

На рис. 20 приведена карта X-хромосомы и ряд сцепленных с ее локусами доминантных и рецессивных заболеваний.

В качестве примеров X-сцепленных доминантных фенотипов следует привести редко встречающиеся заболевания: витамин D-резистентный рахит или гипофосфатемия (Xp22.2); синдром недержания пигмента, тип I (Xp11.1) и тип II (Xq28).

Примеры наиболее распространенных заболеваний, наследуемых по X-сцепленному рецессивному типу: гемолитическая анемия (Xq21.2 или Xq28), гемофилия А (Xq28.2) и В (Xq27.2), миодистрофия Дюшенна-Беккера (Xp21.2), синдромы Леша-Найяна (Xq26.2),

Лоу (Xq25.2), Менкеса (Xp11.1), Мартина-Белл (Xq27.2 или Xq27.3),

точечная хондродисплазия Конради-Хюнерманна (Хр22.2), пигментный ретинит (Хр21.2-21.3; Хр22).

На рис. 21 приведено схематическое изображение локусов Y-хромосомы, в которых расположены гены, формирующие мужской пол, и гены, обуславливающие мужское бесплодие.

В качестве примеров заболеваний, сцепленных с Y-хромосомой, следует привести нарушения дифференцировки пола, формы мужского бесплодия в виде азооспермии (Yp - фактор 2; Yq11 - фактор 1), гонадобластому и др. Всего на схеме выделены гены, ответственные за семь таких заболеваний.

Кроме того, моногенное наследование может быть не только сцеплено с полом (X- или Y-хромосомой), но и ограничено полом.



Рис.

20. Карта X-хромосомы человека (по мультимедийному учебнику «Биология» Copyright (с), 2007)

Например, ген плешивости проявляется у мужчин (доминантный эффект) и почти не проявляется у женщин (рецессивный эффект).

Критерии моногенного наследования

Аутосомно-доминантный тип:

- заболевание регулярно передается из поколения в поколение без пропусков, т.е. прослеживается в родословной по вертикали, кроме случаев мутаций *de novo* (см. главу 5);

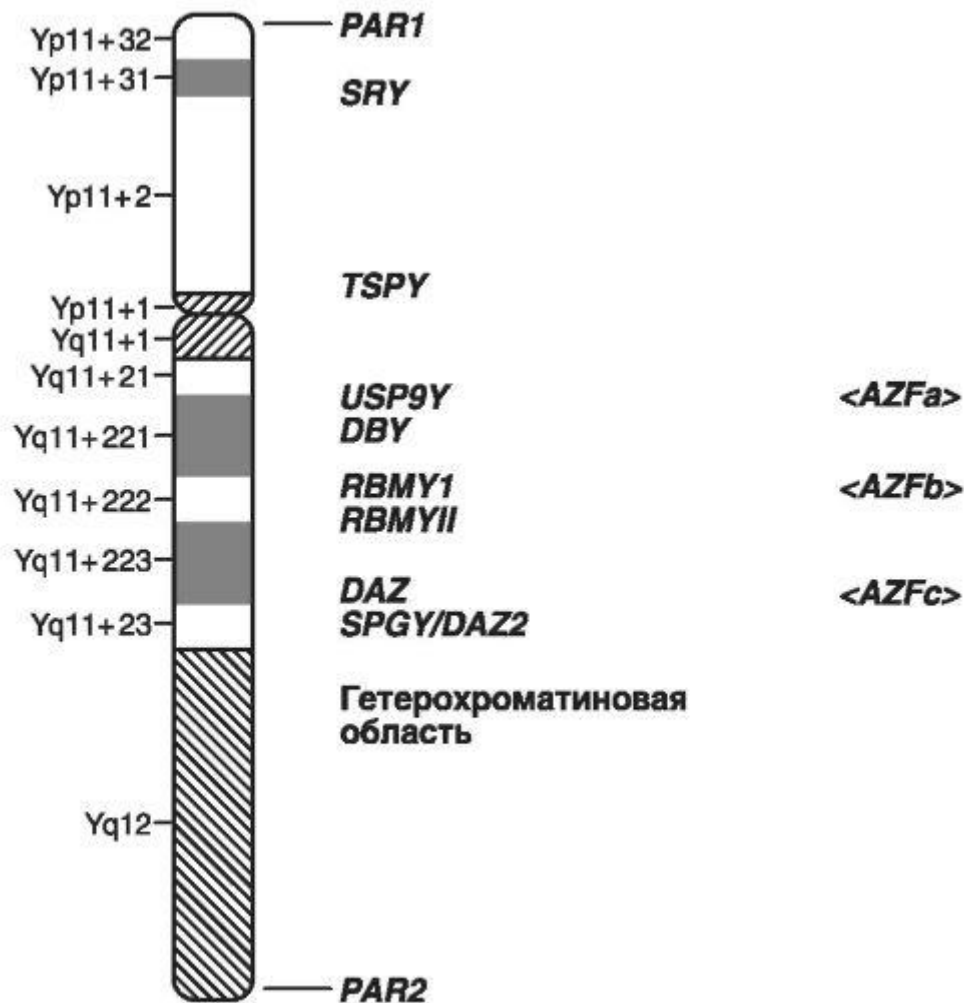


Рис.

21. Схематическое изображение Y-хромосомы (по GenBank, 2003)

- риск рождения больного ребенка, если болен один из родителей, составляет 50%;
- здоровые индивиды имеют здоровых потомков;
- у больного индивида болен один из родителей, кроме случаев новой мутации;
- оба пола поражаются с одинаковой частотой. Аутосомно-рецессивный тип:
- родители больного пробанда (лицо, обратившееся за консультацией к врачу-генетику) здоровы, но аналогичное заболевание обнаруживается у родных, двоюродных и троюродных сибсов пробанда (его братья и сестры), т.е. прослеживается в родословной по горизонтали (в одном поколении);
- у больного родителя рождаются здоровые дети;
- риск рождения больного ребенка равен 25% (соотношение больных и здоровых лиц составляет 1:4);
- в случае кровнородственных браков между родителями больного пробанда наблюдается увеличение числа больных родственников в родословной.

X-сцепленный доминантный тип:

- у больного пробанда обязательно болен один из родителей;
- у больного отца все дочери больны, а сыновья здоровы;
- у больной матери рождение больной дочери и больного сына одинаково вероятно;
- у здоровых родителей все дети будут здоровы;
- больных женщин в 2 раза больше, чем больных мужчин. Х-сцепленный рецессивный тип:
- заболевание наблюдается у мужчин - родственников больного пробанда по материнской линии;
- сыновья не наследуют заболевание отца;
- у больного отца все дочери здоровы и являются гетерозиготными носителями гена болезни отца;
- если женщина - гетерозиготный носитель гена болезни, то половина ее сыновей будут больны, а все дочери здоровы; причем половина дочерей также станут гетерозиготными носителями гена болезни.

Критерии голандрического наследования пока не разработаны. В последние годы у человека выделен ряд сложно наследуемых моногенных и полигенных болезней:

- дигенные болезни - рак грудной железы (две генокопии: гены BRC1 и BRC2);
- тригенные болезни - синдром Барде-Бидля (3 генокопии: гены BBS1, BBS2 и BBS30);
- четырехгенные - пятигенные болезни: болезнь Альцгеймера (обусловлена четырьмя генокопиями: PS1, PS2, PS3 и PS4, а также геном прионного белка, см. главу 29);
- полигенные, или мультифакториальные болезни (МФБ), обусловленные «генными сетями» - артериальная гипертензия (170 генов, включая 17 главных генов), бронхиальная астма (около 20 генов), остеопороз (13 генов), эндометриоз (11 генов) и др.

Полигенное наследование

Полигенное наследование нередко называют мультигенным или мультифакториальным, имея в виду наследование одновременно не одного, а нескольких определенных генов, проявляющих свое

действие в специфических условиях окружающей среды, при наличии провоцирующих внешних факторов, как правило, усиливающих индивидуальное действие генов, эффект которых суммируется (аддитивное действие).

Критерии полигенного наследования (всего 5) систематизированы в 1969 г. К. Картером, а спустя 20 лет их дополнили (еще два) Ф. Фогель и А. Мотульски (1989).

Критерии полигенного наследования

Риск развития мультифакториального признака (заболевания) определяют следующие факторы.

- Наследуемость признака или болезни. Чем выше наследуемость признака или заболевания (чем больше унаследовано генов, за него ответственных), тем выше риск его развития у здоровых родственников. Наследуемость признака (заболевания) - это степень

влияния на формирование данного признака (заболевания) наследственных факторов в сравнении с таковой факторов среды. Наследуемость выражается в абсолютных цифрах (от нуля до единицы) или процентах при помощи коэффициента h^2 или K_n , который рассчитывается по формуле: $K_n = G/E \times 100\%$, где K_n - коэффициент наследования, G - наследственные факторы, E - факторы окружающей среды. В таблице 4 приведены значения ряда коэффициентов наследования мультифакториальных признаков и заболеваний.

Таблица 4. Коэффициенты наследования мультифакториальных признаков и заболеваний

Название патологии	K_n %
Шизофрения:	
злокачественная форма	85
вялотекущая форма	74
Бронхиальная астма	80
Расщелина губы и нёба	76
Сердечно-сосудистые заболевания	65
Артериальная гипертензия	62
Дефекты невральнoй трубки	60
Изолированный врожденный порок сердца	35

- Степень выраженности признака или тяжесть течения болезни у пробанда. Чем сильнее выражен признак или тяжелее протекает

заболевание у больного родственника, тем выше риск его развития у здоровых родственников.

- Общность генов у пробанда и его родственников (или близкая степень родства с больным родственником). Чем больше общих генов у больного и его родственников, тем выше риск развития у последних признака или заболевания. Например, популяционная частота псориаза составляет 0,75%. У родственников I степени родства частота его развития - 5,6%, у родственников II степени родства - 3,0-3,5%, у родственников III степени родства - 1,75%, у родственников IV степени родства - 0,75%.

- Редко поражаемый пол. Мультифакториальный признак или заболевание проявляется чаще у лиц редко поражаемого пола (критерий, названный *эффектом Картера*). Например, врожденный пилоростеноз у мальчиков встречается в 2-5 раз чаще, чем у девочек, т.е. в данном случае женский пол - редко поражаемый пол. Однако частота этой болезни у будущих детей пораженных пилоростенозом девочек достигнет 10-20%, тогда как у будущих детей пораженных пилоростенозом мальчиков - только 2-6%. Другой пример - язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, как правило, проявляющаяся у лиц мужского пола и гораздо реже - у лиц женского пола. Однако ее частота у детей больной женщины выше, чем у детей больного мужчины.

- Число больных родственников. Чем больше в родословной родственников, имеющих мультифакториальный признак или заболевание, тем выше риск его развития у потомков (табл. 5).

Таблица 5. Риск развития мультифакториального признака или заболевания у пробанда в зависимости от числа его больных родственников

Название патологии	Число больных и риск болезни		
	1	2	3
Врожденный порок сердца:			
дефект межжелудочковой перегородки	1:20	1:7	1:2
тетрада Фалло	1:40	1:12	1:4
Дефекты невральнoй трубки	1:40	1:12	1:4
Эпилепсия	1:30	1:10	1:3
Бронхиальная астма	1:20	1:7	1:2
Недифференцированная УМО	1:20	1:7	1:2
Шизофрения	1:20	1:4	1:2
Паховая грыжа	1:10	1:4	1:2
Инсулинзависимый сахарный диабет	1:20	1:3	1:2

Общий риск для детей, если их родители здоровы, составляет 5-10%; если болен один из родителей - 10-20%; если больны оба родителя - до 40%;

Дополнительные критерии

- Близнецовый критерий . Если конкордантность (сходство) монозиготных близнецов по какому-то признаку или заболеванию в 4 раза выше конкордантности у дизиготных близнецов, то этот признак или заболевание наследуется по полигенному варианту.
- Критерий сегрегационного отношения пораженных sibсов в семьях с одним больным или двумя здоровыми родителями. Если доля больных sibсов в семьях с одним больным родителем выше в 2,5 раза (и более), чем доля больных sibсов в семьях с двумя здоровыми родителями, то особенно вероятен полигенный вариант наследования. Если указанное соотношение меньше 2,5, то полигенное наследование также не исключено.

Однако классические варианты наследования генов и признаков имеют место лишь в меньшей части всех случаев такого наследования, тогда как почти $\frac{2}{3}$ из них - нетрадиционные варианты.

Нетрадиционное наследование

Нетрадиционное наследование отмечается при многих наследственных болезнях человека. В последние годы к ним отнесены ранее плохо изученные или вообще неизвестные заболевания 6 классов: болезни накопления (44 нозологии; см. главу 21); пероксисомные болезни (17 нозологий; см. главу 26); митохондриальные болезни (выделено свыше 200 нозологий, предполагается наличие еще около 1150; см. главу 26); болезни импринтинга (выделены 24 нозологии; см. главу 28); болезни экспансии числа нуклеотидных повторов (27 нозологий; см. главу 27); прионные болезни (9 нозологий; см. главу 29).

В целом на долю болезней нетрадиционного наследования приходится 321 нозологическая единица (без учета 1150 митохондриальных болезней). При наследовании заболеваний первых трех классов речь идет о материнском наследовании, т.к. лизосомы, митохондрии и пероксисомы, являясь цитоплазматическими структурами соматических клеток, наследуются исключительно по линии мать-дочь и никогда не передаются по линиям мать-сын, отец-сын или отец-дочь, что обусловлено *биологическим матриархатом* (см. главы 5 и 12).

Вместе с тем, при ряде митохондриальных болезней, помимо чисто материнского наследования, может наблюдаться смешанное с материнским моногенное наследование. Оно связано с нарушениями взаимодействия между митохондриальным (мтДНК) и ядерным (ДНК) геномами. В частности, гены, кодирующие митохондриальные белки, находятся либо в митохондриях (гены двух типов рРНК, 22 типов тРНК, 13 типов полипептидов), либо в ядре клетки (их примерно 1150). Ядерные гены транскрибируются в ядре, транслируются в цитоплазме, а результаты их экспрессии «импортируются» митохондриями.

Обычно все копии мтДНК идентичны между собой (гомоплазия). В случаях, когда в мтДНК возникают мутации (их частота в 10 раз чаще, чем в ядерной ДНК), возможно наличие в одной клетке двух типов мтДНК (гетероплазия), и тогда процесс распространения мутантной и нормальной мтДНК называется *репликативной сегрегацией* (см. главу 2).

В случае болезней импринтинга или эпигеномного выключения из экспрессии локусов хромосом одного из родителей (см. выше) фенотипические проявления действия гена могут меняться в результате трех причин: делеция гена (генетический импринтинг), однородительская изодисомия (хромосомный импринтинг) и нарушение генной экспрессии в центре импринтинга.

Генетический импринтинг основан на механизме специфического метилирования цитозиновых оснований молекулы ДНК, выключающем транскрипцию гена (см. главу 28).

В настоящее время предполагается существование около 200 генов, подверженных такому импринтингу и имеющих тканеспецифическую моноаллельную экспрессию, а также обнаружены три кластера генов, локализованных в критических областях хромосом (7q32, 11p15 и 15q11.2-q13) и оказывающих прямое влияние на развитие наследственной патологии по такому механизму, в том числе опухолей.

Геномный импринтинг основан на однородительской изодисомии по конкретной хромосоме либо материнского, либо отцовского происхождения. Он наблюдается при ряде наследственных и врожденных заболеваний, таких, как: синдромы Ангельмана (причина - однородительская изодисомия по отцовской хромосоме 15) и Прадера-Вилли (изодисомия по материнской хромосоме 15); транзиторный неонатальный сахарный диабет (отцовская хромосома 6); синдром Сильвера-Рассела (материнская хромосома 7); синдром

Беквитта-Видемана (отцовская хромосома 11); задержка физического и моторного развития, гипотония и преждевременное половое развитие (материнская хромосома 14); задержка внутриутробного развития (ЗВУР) плода (материнская хромосома 7), а также ЗВУР с ограниченным плацентарным мозаицизмом (материнская хромосома 16).

Эффект геномного импринтинга имеет место также при пузырьном заносе. Отмечены 4 типа нарушений:

- андрогенез или двойной набор хромосом (2n): два сперматозоида с X-хромосомами и яйцеклетка без ядра;
- гиногенез или двойной набор хромосом (2n): яйцеклетка с двойным набором хромосом, сперматозоиды не участвуют в оплодотворении;
- андронид или тройной набор хромосом (3n): 2 отцовских и 1 материнская;
- гиноид или тройной набор хромосом (3n): 2 материнские и 1 отцовская.

Импринтинг в результате ошибок генной экспрессии в центре импринтинга

происходит также при синдромах Ангельмана и Прадера-Вилли. Он обусловлен тем, что оба родителя передают больному потомку гены, несущие их специфические свойства, т.е. гены отца и матери активированы или супрессированы у потомка по-разному (так называемые *импринтированные гены*). Причем по линии как матери, так и отца наследуются именно родительские нарушения генной экспрессии в центре импринтинга.

В настоящее время выделено не менее 60 импринтированных генов (или их транскриптов) на 1, 5-7, 11, 13, 15, 19 и 20 аутосомах и X-хромосоме.

Следует отметить, что при синдромах Ангельмана и Прадера-Вилли также обнаружены близко расположенные, но противоположно импринтированные гены. Их называли *генами-кандидатами заболеваний* (в семьях с повторными случаями этих синдромов). Причем гены-кандидаты синдрома Ангельмана экспрессировались исключительно на материнской хромосоме, но репрессировались на отцовской хромосоме, тогда как гены-кандидаты синдрома Прадера-Вилли экспрессировались на отцовской хромосоме, но репрессировались на материнской хромосоме (см. главу 28).

Таким образом, импринтинг есть результат качественных, а не количественных изменений наследственного материала.

В конце XX в. выделили также ранее неизвестный класс болезней с нетрадиционным наследованием - болезней экспансии нуклео-

тидных повторов, связанных с увеличением числа кодирующих и некодирующих последовательностей нуклеотидов в результате динамических мутаций. Динамическая мутация «движется» от состояния фенотипически не проявляющейся премутации к состоянию фенотипически проявляющейся полной мутации. Такие мутации лежат в основе ряда тяжелых наследственных нейродегенеративных заболеваний (27 нозологий; см. главу 27). Например, повтор ЦЦГ характерен для синдрома Мартина-Белл (Xq23), повтор ГГЦ - для второго варианта этого синдрома (Xq28); повтор ЦТГ - для спинобульбарной мышечной атрофии (Xq11-12); ЦАГ - для миотонической дистрофии (19q13.3); ЦТГ - для хорей Гентингтона (4p16.3); ЦТГ - для спинально-мозжечковой атаксии, тип I (6p21.3); ЦТГ - для болезни Мачадо-Джозефа (14q32.1); ТТЦ - для атаксии Фридрейха (9p13). Во всех случаях происходит постепенное накопление (экспансия) критического числа нуклеотидных повторов.

Параллельно с экспансией в каждом последующем поколении нарастает тяжесть течения заболевания - *антиципация*.

ПОКАЗАТЕЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПОНЯТИЯ ГЕНОМИКИ И ПРОТЕОМИКИ

Согласно закономерностям генетики, отцовский и материнский геномы, объединившиеся в генотипе одной клетки и целого организма, вступают между собой во взаимодействие на

протяжении всего онтогенеза, создавая индивидуальную внешнюю и внутреннюю характеристику, фенотип организма.

Выделяют три группы механизмов взаимодействия между родительскими генами и соответственно три группы показателей, относящихся к дополнительным понятиям геномики и протеомики. Это взаимодействия между:

- аллельными генами; их характеризуют: доминирование, рецессирование, кодоминирование, неполное и условное доминирование, сверхдоминирование;
- неаллельными генами; их характеризуют: эпистаз, комплементарность, полимерия;
- отдельным геном и генотипом (как системой генов); их характеризуют: экспрессивность, пенетрантность, эффект положения,

генокопирование, эффект плейотропии, аллельные серии и фенокопирование.

Рассмотрим эти механизмы как дополнительные понятия геномики и протеомики.

Механизмы взаимодействия между аллельными генами

Доминирование и рецессирование

Если функциональное состояние одного аллеля (например, материнский аллель) не зависит от состояния другого аллеля (отцовский аллель), то у потомка проявится признак, контролируемый материнским аллелем. Такой ген и контролируемый им признак называются доминантными.

Первое описание эффекта доминирования относится к 1905 г., когда в родословной семьи больного с брахидактилией была отмечена короткопалость. Другими примерами служат: белый локон, «куриная слепота», габсбургская губа, полидактилия (многопалость), синдактилия (сращение мягких или костных тканей фаланг), арахнодактилия («паучьи пальцы»), хондродистрофия, а также многочисленные формы аутосомно-доминантных заболеваний, например хорea Гентингтона (4p16.3).

Если функциональное состояние одного аллеля (например, материнский аллель) зависит от состояния другого аллеля (отцовский аллель), то у потомка проявится признак, контролируемый и материнским, и отцовским аллелями одновременно. При этом и сам ген, и контролируемый им признак называются рецессивными.

Примеры наследования рецессивных признаков и фенотипов: альбинизм, мягкие прямые волосы, курносый нос, светлые глаза, резусотрицательная I группа крови, неспособность ощущать вкус фенилтиокарбамида; многочисленные формы аутосомно-рецессивных заболеваний, например генокопии фенилкетонурии (12q24.2; 4p15.1).

В некоторых случаях доминантность и рецессивность генов плохо соотносятся с доминантностью и рецессивностью признаков. Например, эпикант у монголоидов контролируется доминантным геном, а у бушменов и готтентотов - рецессивным геном.

Другой пример - упомянутые выше ген и признак плешивости, проявляющиеся у мужчин как доминантные, а у женщин как рецессивные. Как оказалось, такой механизм обусловлен действием гормонов, т.е. имеет место зависимое от пола (контролируемое полом) наследование.

Неполное доминирование

О неполном доминировании, или промежуточном действии генов (проявлении признаков), говорят при ослаблении действия доминантного гена в присутствии рецессивного гена, т.е. у гетерозигот. Однако четкую границу между промежуточным действием и доминантностью с одной стороны, а также промежуточным действием и рецессивностью с другой стороны, провести нельзя. Например, пигментация кожи у человека варьирует от белого цвета у альбиносов до черного цвета у негров. От браков между белыми и неграми рождаются мулаты, имеющие промежуточный цвет кожи.

Другой пример неполного доминирования - различия по 6 типам певческого голоса, которые контролируются одной аллельной парой. В частности, баритон и меццо-сопрано наблюдаются только у гетерозигот, тогда как тенор и бас, альт и сопрано характерны для гомозигот.

При дальнейших исследованиях, правда, обнаружилось: пигментация кожи и тип певческого голоса определяются не только этим механизмом взаимодействия, но и независимыми друг от друга факторами: влиянием половых гормонов, эффектом полимерии, сцепленным с полом или зависимым от пола наследованием.

Условное (неустойчивое) доминирование

При неустойчивом или условном, доминировании проявление признака у гетерозигот зависит от генотипа и внешних условий (модифицирующее воздействие генотипа на главный ген, пенетрантность гена, местоположение гена в составе хромосомы, воздействие температуры).

Кодоминирование

Если аллельные гены активны в одинаковой мере (обладают одинаковым доминантным действием), то это кодоминирование. Классический его пример - наследование IV группы крови (по системе ABO), определяемой тремя аллелями, расположенными в 9-й хромосоме (множественность аллелей). Среди них - два доминантных аллеля (I^A и I^B) и один рецессивный аллель (I^0). Попарное сочетание этих аллелей дает 4 группы крови:

- *первая группа* - наличие двух одинаковых рецессивных аллелей - I^0I^0 (гомозигота), обуславливающих присутствие в сыворотке крови альфа- и бета-антител;
- *вторая группа* - наличие двух одинаковых доминантных аллелей I^AI^A (гомозигота) или двух разных аллелей I^AI^0 (гетерозигота), обуславливающих присутствие в сыворотке крови бета-антител;
- *третья группа* - наличие двух одинаковых доминантных аллелей M^B (гомозигота) или двух разных аллелей M^0 (гетерозигота); в сыворотке крови присутствуют альфа-антитела;
- *четвертая группа* - наличие двух разных доминантных аллелей I^AI^B (гетерозигота); в сыворотке крови нет антител, оба аллеля взаимодействуют с одинаковой силой, нейтрализуя друг друга.

Еще один пример кодоминантности - наследование серповидноклеточной анемии, являющейся аутосомно-рецессивным заболеванием (11p15). В данном случае наблюдается гомозиготность (2 патологических аллеля одного гена, контролирующего синтез дефектного гемоглобина). Такие гомозиготы имеют характерную симптоматику, но они невосприимчивы к малярии, ибо малярийный плазмодий не воспроизводится на дефектном гемоглобине.

Вместе с тем, в гетерозиготном организме одновременно присутствуют нормальный и дефектный аллели одного и того же гена. Причем оба аллеля дают одинаковый

доминантный эффект, и поэтому в клетках одновременно синтезируются два вида гемоглобина (нормальный и аномальный). У таких гетерозиготных носителей патологического гена симптомов серповидноклеточной анемии нет либо она проявляется в легкой форме и только в условиях кислородной недостаточности.

Сверхдоминирование

В ряде случаев аллели, находящиеся в гетерозиготном состоянии, фенотипически проявляются сильнее, чем аллели, находящиеся в гомозиготном состоянии (эффект сверхдоминирования). Такое их проявление напоминает *эффект гетерозиса* у растений (гибридная мощь или сила). Так, в случае браков между представителями разных рас показатели здоровья их потомков превосходят таковые самих родителей: дети отличаются более высокими жизнеспособностью, продолжительностью жизни и др.

Механизмы взаимодействия между неаллельными генами

Эпистаз

Эпистаз - подавление действия гена, находящегося в одной неаллельной паре, действием гена из другой неаллельной пары, например подавление геном А гена В, т.е. $A > B$ или $A > bb$. Выделяют доминантный и рецессивный эпистаз.

Доминантный эпистаз: доминантный аллель одной неаллельной пары, находящийся в гомозиготном (АА) или гетерозиготном (Аа) состоянии, подавляет проявление неаллельного к нему доминантного аллеля другой аллельной пары, находящейся в состоянии АА или Аа. Гены, дающие доминантный эффект, называются эпистатическими генами или супрессорами (ингибиторами). Они могут быть как доминантными, так и рецессивными. Подавляемые гены именуются гипостатическими генами.

Если гены, находящиеся в других неаллельных парах, усиливают доминантное действие эпистатических генов, то они называются генами-модификаторами (интенсификаторами).

Такой тип взаимодействия характерен для неаллельных генов, участвующих в регуляции онтогенеза, например генов иммунного ответа (генная сеть - 2190 генов; см. главу 15) или генов эритропоэза (генная сеть - 200 генов).

Возможны два варианта доминантного эпистаза:

- гомозиготы с рецессивными аллелями (аа) отличаются по фенотипу от гомозигот с доминантными аллелями (АА);
- гомозиготы по доминантным аллелям (АА) не отличаются по фенотипу от гомозигот по рецессивным аллелям (аа).

Рецессивный эпистаз проявляется в том, что рецессивный аллель одного гена подавляет действие неаллельного ему доминантного гена ($aa > B$), а между доминантными генами наблюдается комплементарность (см. ниже). Примером рецессивного эпистаза у человека служит «бомбейский феномен», связанный с рождением детей с I (I^0I^0) и IV (I^AI^B) группами крови от родителей с I (I^0I^0) и II (I^AI^0) группами крови, тогда как теоретически от таких родителей должны рождаться дети с I (I^0I^0) или II (I^AI^0) группами крови. Феномен можно объяснить либо наличием не распознанного у одного из родителей редкого гетерозиготного варианта III группы крови (I^BI^0), либо наличием в генотипе ребенка с IV группой крови (I^AI^B) рецессивных генов-модификаторов, которые в гомозиготном состоянии подавляют экспрессию антигенов, находящихся на поверхности эритроцитов, т.е. дают непредсказуемый фенотипический эффект.

Кроме рецессивного эпистаза, выделен двойной рецессивный эпистаз; при нем у рецессивных генов собственное фенотипическое проявление, а в двойных гомозиготах рецессивные аллели подавляют друг друга: $aa > bb$, $bb > aa$.

Комплементарность

Комплементарность - тип взаимодействия не менее чем двух доминантных неаллельных генов из нескольких пар с разным сочетанием доминантных и рецессивных аллелей, обуславливающих развитие нового признака, отличного от родительских вариантов.

Известно три типа комплементарности:

- доминантные аллели (АВ) различаются по фенотипическому проявлению;
- доминантные аллели (АВ) сходны по фенотипическому проявлению;
- у доминантных (А) и рецессивных (а) аллелей из нескольких неаллельных пар - самостоятельное фенотипическое проявление.

Например, у человека нормальный слух обусловлен взаимодействием нескольких пар неаллельных генов, но в парах должен находиться как минимум один доминантный аллель. Если же человек окажется рецессивной гомозиготой (хотя бы по одной паре неаллельных генов), то он будет глухим.

Другими примерами комплементарности служат фенотипы онкологических больных с ретинобластомой и нефробластомой (см. главу 25).

Полимерия и формирование количественных признаков

Полимерия - это обусловленность признака или фенотипа взаимодействием генов, локализованных в нескольких неаллельных парах и дающих одинаковый эффект. Такие гены называются полимерными генами или полигенами. Степень проявления признака (фенотипа) зависит как от числа доминантных генов в неаллельных парах, так и от числа неаллельных пар.

Такие признаки называются количественными признаками. Они существенно отличаются от качественных признаков.

Если количественные признаки контролируются генами, наследуемыми полигенно, и проявляются во многих состояниях как переходные формы, то качественные признаки контролируются генами, наследуемыми моногенно, и проявляются только в альтернативных состояниях без переходных форм.

Примерами количественных признаков являются: упоминавшиеся выше варьирующая пигментация кожи у человека и наличие промежуточного цвета кожи у мулатов.

Другие примеры количественных признаков: уровень (состояние) здоровья человека, продолжительность жизни, интеллектуальные способности, масса и длина тела.

В последние годы выделен феномен взаимодействия между многочисленными неаллельными генами - кумулятивная полимерия. В данном случае речь идет об аддитивном (суммирующем) действии генов, каждый из которых оказывает свое (часто небольшое) влияние на признак. Именно кумулятивная полимерия формирует упомянутые выше генные сети, контролирующие значительную часть количественных признаков организма.

Среди генов, влияющих на количественный признак, могут оказаться один главный ген и ряд более слабых по сравнению с ним генов (полигены). Действие главного гена порой значительно превосходит таковое других генов, и контролируемый главным геном признак наследуется как менделевский (моногенный вариант наследования), а признаки, контролируемые полигенами, наследуются по полигенному варианту. Пример - наследование карликовости, обусловленной главным геном в случае ахондроплазии, тогда как в нормальной популяции рост человека определяется аддитивным действием полигенов.

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ОТДЕЛЬНЫМ ГЕНОМ И ГЕНОТИПОМ

Экспрессивность и пенетрантность

Эти понятия впервые введены в 1926 г. Н.В. Тимофеевым-Рессовским и О. Фогтом для описания варьирующего проявления признаков и контролирующих их генов. Экспрессивность есть степень выраженности (варьирования) одного и того же признака у разных лиц, имеющих ген, контролирующий данный признак. Наблюдается низкая и высокая экспрессивность. Рассмотрим, например, разную выраженность ринита (насморка) у трех разных больных (А, Б и С) с одним и тем же диагнозом ОРВИ. У больного А ринит выражен в легкой степени («шмыгание носом»), позволяющей в течение дня обходиться одним носовым платком; у больного Б ринит выражен в средней степени (ежедневно 2-3 носовых платка); у больного С - высокая степень выраженности ринита (5-6 носовых платков). Когда говорят об экспрессивности не отдельно взятого признака, а заболевания в целом, врачи часто оценивают состояние больного как удовлетворительное или средней степени тяжести, или как тяжелое,

т.е. в данном случае понятие экспрессивности аналогично понятию «тяжесть течения болезни».

Пенетрантность - это вероятность проявления одного и того же признака у разных лиц, имеющих ген, контролирующий данный признак. Пенетрантность измеряется в проценте лиц с определенным признаком от общего числа лиц, являющихся носителями гена, контролирующего данный признак. Она бывает неполной или полной.

Примером заболевания с неполной пенетрантностью служит все тот же ринит при ОРВИ. Так, можно считать, что у больного А нет ринита (но есть другие признаки заболевания), тогда как у больных В и С ринит есть. Поэтому в данном случае пенетрантность ринита составляет 66,6%.

Пример заболевания с полной пенетрантностью - аутосомнодоминантная *хорея Гентингтона* (4p16). Она манифестирует преимущественно у лиц в возрасте 31-55 лет (77% случаев), у остальных же больных - в другом возрасте: как в первые годы жизни, так и в 65, 75 лет и более. Важно подчеркнуть: если ген этой болезни передан потомку от одного из родителей, то болезнь проявится обязательно, в чем заключается полная пенетрантность. Правда, пациент не всегда доживает до манифестации хорей Гентингтона, умирая от другой причины.

Эффект положения

Другой тип зависимости действия гена от генотипа - эффект положения. Открыл его А. Стертевант (1925). Суть эффекта - в изменении экспрессии гена при изменении занимаемого им положения (позиции) в хромосоме (в ряду нуклеотидных последовательностей).

По современным представлениям, эффект положения не связан с нарушением структуры гена: он и его промоторная область сохраняются как единица транскрипции. Следовательно, эффект положения - эпигеномное событие, определяемое тремя условиями:

- в промоторе происходит инициация транскрипции;
- регуляторные элементы (энхансеры и сайленсеры), содержащие сайты связывания факторов транскрипции, увеличивают специфичность транскрипционного комплекса на промоторе;
- организация хроматина в районе локуса способствует повышенной чувствительности к действию нуклеаз.

Уровень экспрессии зависит от местоположения гена в геноме: либо в районах конденсированного гетерохроматина, либо в районах

неконденсированного хроматина (эухроматина), который деконденсирован в интерфазе, содержит большинство генов и реплицируется в начале S-фазы. В свою очередь, гетерохроматин конденсирован в течение всего клеточного цикла, реплицируется в конце S-фазы и содержит в основном повторяющиеся последовательности. Центромерные области хромосом состоят из структурного гетерохроматина или плотно конденсированного хроматина, содержащего повторяющиеся последовательности.

В связи с этими особенностями при формировании структурных перестроек хромосом их разрывы ведут к изменению положения генов, что сопровождается изменением их экспрессии (рис. 22). Доминантный ген А, оказавшийся вблизи места разрыва хромосомы, в большей степени утрачивает свое влияние, чем ген В, расположенный дальше от места разрыва. Иными словами, ослабление эффекта доминантного гена пропорционально расстоянию между ним и точкой разрыва хромосомы.

В других случаях хромосомная перестройка может:

- отделить транскрипционную единицу от регуляторного района, полностью нейтрализовав его влияние на ген (отсутствие энхансера снижает или устраняет транскрипцию в соответствующей ткани); в свою очередь, разделение гена и его сайленсера приведет к аномальному увеличению экспрессии;
- переместить ген в район энхансера другого гена, что вызовет неадекватную экспрессию (например, при лимфоме Беркитта транслокация перемещает ген с-тус под контроль энхансера иммуноглобина);
- переместить ген и его регуляторные последовательности в район другого гена, что снижает уровень экспрессии первого гена;
- вызвать мозаичный эффект положения (например, красный и белый цвет глаз у дрозофилы).

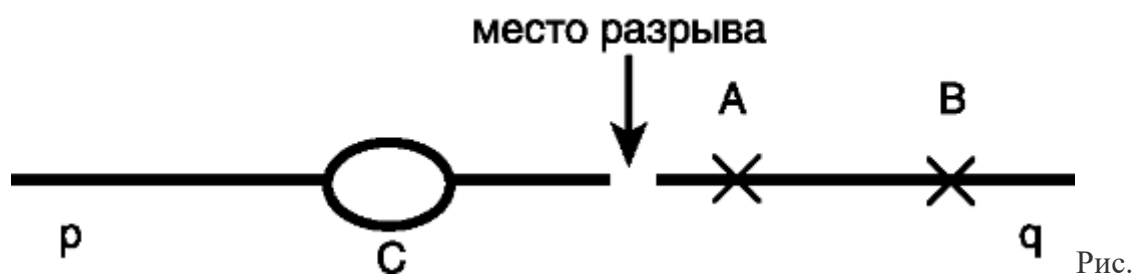


Рис. 22. Эффект положения в случае разрыва хромосомы:

C - центромера; p и q - короткое и длинное плечи хромосомы; X - генный локус; A и B - доминантные гены

Другой пример проявления эффекта положения - индивиды с группами крови по системе Rh. В частности, лица с генным комплексом CDE/cDe имеют те же гены, что и лица с генным комплексом cDe/CDE (где заглавная буква - доминантный ген, а прописная буква - рецессивный ген). Однако у первых много антигена E и мало антигена C, а у вторых - наоборот, что объясняется неодинаковой локализацией генов C и E - на одной хромосоме или на разных хромосомах соответственно.

Еще один пример - аутосомно-доминантная лице-лопаточноплечевая миодистрофия типа 1A, обусловленная делецией варибельного участка в субтеломерной части длинного плеча хромосомы (расположен в сегменте 4q35), который не содержит генов, но имеет нуклеотидные последовательности размерами 20-250 кб. Делеция этих последовательностей приводит к изменению структуры гетерохроматина в данной области хромосомы и опосредованному ингибированию транскрипции близлежащего гена (FRG1), расположенного проксимально от точки разрыва хромосомы.

Назовем еще ряд наследственных заболеваний, связанных с эффектом положения. Среди них:

- аниридия в результате делеции гена, расположенного в локусе 11p13;
- голопрозэнцефалия - мутация в гене SSN (7q36);
- краниосиностоз Сатре-Котцен - мутация в гене TWIST (7p21);
- цефалополисиндактилия Грейга в результате мутации гена CL13 (7p13);
- синдром Ригера - ген PITX2(4q25-q27);
- XY-реверсия пола - мутация в гене SRY (Xq).

Генокопирование и его причины

Один и тот же признак (группа признаков) бывает обусловлен разными генетическими причинами (или гетерогенностью). Такой эффект, по предложению немецкого генетика Х. Нахтхайма, получил в середине 40-х годов XX в. название генокопирования. Известны три группы причин генокопирования.

Причины первой группы объединяет гетерогенность за счет полилокусности, или действия разных генов, расположенных в разных локусах на разных хромосомах. Например, среди

наследственных болезней обмена сложных сахаров - глюкозаминогликанов выделены 19 типов (подтипов) мукополисахаридозов. Все типы харак-

теризуются дефектами разных ферментов, но проявляются одной и той же (либо сходной) симптоматикой *гаргоилического дисморфизма* или фенотипа звонаря Квазимодо - главного героя романа «Собор Парижской Богоматери» классика французской литературы Виктора Гюго. Схожий фенотип нередко наблюдается и при муколипидозах (нарушениях обмена липидов).

Другой пример полилокусности - фенилкетонурия. Сейчас выделены не только ее классический тип, обусловленный дефицитом фенилаланин-4-гидроксилазы (12q24.2), но и три атипичные формы: одна вызвана дефицитом дигидроптеридинредуктазы (4p15.1), а еще две - дефицитом ферментов пирувоилтетрагидроптерин-синтетазы и тетрагидробиоптерина (соответствующие гены пока не определены).

Дополнительные примеры полилокусности: гликогенозы (10 генокопий), синдром Эллерса-Данлоса (8), нейрофиброматоз Реклингаузена (6), врожденный гипотиреоз (5), гемолитическая анемия (5), болезнь Альцгеймера (5), синдром Барде-Бидля (3), рак грудной железы (2).

Причины второй группы объединяет внутрилокусная гетерогенность. Она обусловлена либо множественным аллелизмом (см. главу 2), либо наличием генетических компандов, или двойных гетерозигот, имеющих два одинаковых патологических аллеля в идентичных локусах гомологичных хромосом. Пример последнего - гетерозиготная бета-талассемия (11p15.5), формирующаяся в результате делеций двух генов, кодирующих бета-цепи глобинов, что ведет к повышенному содержанию гемоглобина HbA₂ и повышенному (или нормальному) уровню гемоглобина HbF.

Причины третьей группы объединяет гетерогенность за счет мутаций в разных точках одного и того же гена. Пример - муковисцидоз (7q31-q32), развивающийся из-за наличия почти 1000 точковых мутаций в гене, отвечающем за болезнь. При общей длине гена муковисцидоза (250 тыс. н.п.) в нем предполагается обнаружить до 5000 таких мутаций. Данный ген кодирует белок, ответственный за трансмембранный перенос ионов хлора, что ведет к увеличению вязкости секрета экзокринных желез (потовых, слюнных, подязычных и др.) и закупорке их протоков.

Другой пример - классическая фенилкетонурия, обусловленная наличием 50 точковых мутаций в гене, кодирующем фенилаланин-4-гидроксилазу (12q24.2); всего при этой болезни предполагается обнаружить более 500 точковых мутаций гена. Большинство их возникает

из-за полиморфизма по длине рестрикционных фрагментов (RFLP) или по числу tandemных повторов (VNTP). Установлено: главная мутация гена фенилкетонурии в славянских популяциях - R408 W/

NP2/VNTR3.

Эффект плейотропии

Вышеупомянутая неоднозначность характера связей между генами и признаками выражается также в эффекте плейотропии или плейотропного действия, когда один ген вызывает формирование целого ряда признаков.

Например, ген аутосомно-рецессивной атаксии-телеангиэктазии, или *синдрома Луи-Бар* (11q23.2) ответственен за одновременное поражение не менее шести систем

организма (нервная и иммунная системы, кожные покровы, слизистые оболочки органов дыхания и желудочно-кишечного тракта, а также конъюнктивы глаз).

Другие примеры: ген *синдрома Барде-Бидля* (16q21) обуславливает слабоумие, полидактилию, ожирение, пигментную дегенерацию сетчатки; ген анемии Фанкони (20q13.2-13.3), контролирующей активность топоизомеразы I, вызывает анемию, тромбоцитопению, лейкопению, микроцефалию, аплазию лучевой кости, гипоплазию пястной кости I пальца, пороки развития сердца и почек, гипоспадию, пигментные пятна кожи, повышенную ломкость хромосом.

Выделяют первичную и вторичную плейотропию. *Первичная плейотропия* обусловлена биохимическими механизмами действия мутантного белка-фермента (например, недостаточностью фенилаланин-4-гидроксилазы при фенилкетонурии).

Вторичная плейотропия обусловлена осложнениями патологического процесса, развившегося в результате первичной плейотропии. Например, за счет усиленного кроветворения и гемосидероза паренхиматозных органов у больного с талассемией возникают утолщение костей черепа и гепатолиенальный синдром.

Аллельные серии

Точковые мутации одного гена могут обусловить развитие не только одного, но и разных симптомокомплексов. Во втором случае играют роль аллельные серии одного и того же гена. Например, мутации гена адренорецептора, сцепленного с X-хромосомой, становятся причиной *болезни Кеннеди*, если они захватывают область тринуклеотидных повторов в экзоне 1, но способны привести к *син-*

дрому Морриса или тестикулярной феминизации (фенотипически - девочка, генотипически - мальчик, т.е. наличие женского фенотипа при мужском кариотипе), если захватывают другие нуклеотидные последовательности данного гена (мутация в андрогенсвязывающем домене).

Другим примером гетерогенности по типу аллельной серии служат точковые мутации гена рецептора тирозинкиназы - RET, вызывающие четыре наследственные болезни: *семейную медуллярную карциному щитовидной железы*, *болезнь Гиришпрунга*, *множественную эндокринную неоплазию* двух типов - 2A (МЭН2A) и 2B (МЭН2B).

Хотя описываемый феномен открыт относительно недавно, уже известно более 100 моногенных болезней, обусловленных мутациями одного гена по типу аллельной серии. Их причинами служат:

- разные последовательности нуклеотидов (разные точки гена), контролирующие функционально разные домены белка;
- наличие в одном и том же гене модифицирующего мутантного аллеля (аллельный полиморфизм);
- воздействие генетического окружения на проявление мутантного аллеля (в том числе взаимодействие мутантного аллеля с аллелями одного или нескольких генов-модификаторов).

Фенокопирование

Фенокопирование - это копирование симптомокомплекса ненаследственной болезни (сформировавшейся под действием факторов среды) как симптомокомплекса наследственной генетической болезни.

Например, симптоматика эндемического зоба соответствует симптоматике врожденного гипотиреоза, но в первом случае причина - дефицит (либо полное отсутствие) неорганического йода в питьевой воде и продуктах питания (т.е. имеет место фенокопирование), а во втором - различные генетические факторы (т.е. имеет место генокопирование).

Другой пример генокопирования и фенокопирования симптоматики - слепота. Известно, что зрение контролируется группой генов (генная сеть), взаимодействующих друг с другом в ходе онтогенеза и обеспечивающих развитие и поддержание функционирования глаз и головного мозга. Разные причины нарушения целостности этой системы способны обусловить один и тот же результат (слепоту).

Так, вследствие генокопирования слепота может развиваться из-за дефектов хрусталика, определяемых одними генами, дефектов сетчатки, определяемых другими генами, и дефектов роговицы, определяемых третьими генами.

Вследствие же фенокопирования за счет экзогенного влияния среды слепота может развиваться из-за несоблюдения нормативов освещенности жилых и производственных помещений или в результате глазного травматизма.

ГЛАВА 5 ИЗМЕНЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМА

Общие данные

Изменчивость организма есть изменчивость его генома, обуславливающая генотипические и фенотипические различия человека и вызывающая эволюционное разнообразие его генотипов и фенотипов (см. главы 2 и 3).

Внутриутробное развитие зародыша, эмбриона, плода, дальнейшее постнатальное развитие организма человека (младенчество, детство, отрочество, юность, взрослая жизнь, старение и смерть) осуществляются в соответствии с генетической программой онтогенеза, сформировавшейся при слиянии материнского и отцовского геномов (см. главы 2 и 12).

В ходе онтогенеза геном организма индивида и закодированная в нем информация подвергаются непрерывным преобразованиям под действием факторов окружающей среды. Возникшие в геноме изменения могут передаваться из поколения в поколение, обуславливая изменчивость признаков и фенотипа организма у потомков.

В начале XX в. немецкий зоолог В. Хэкер выделил направление генетики, посвященное изучению связей и взаимоотношений между генотипами и фенотипами и анализу их изменчивости, и назвал его феногенетикой.

В настоящее время феногенетики выделяют два класса изменчивости: ненаследственную (или модификационную), которая не передается из поколения в поколение, и наследственную, которая передается из поколения в поколение.

В свою очередь, наследственная изменчивость также бывает двух классов: комбинативная (рекомбинационная) и мутационная. Изменчивость первого класса определяют три механизма: случайные встречи гамет при оплодотворении; кроссинговер, или мейотическая рекомбинация (обмен равными участками между гомологичными хромосомами в профазе первого деления мейоза); независимое расхождение гомологичных хромосом к полюсам деления при образовании дочерних клеток в ходе митоза и мейоза. Изменчивость второго

класса обусловлена точковыми, хромосомными и геномными мутациями (см. ниже).

Последовательно рассмотрим различные классы и типы изменчивости организма на разных этапах его индивидуального развития.

Изменчивость при оплодотворении гамет и начало функционирования генома зародившегося организма

Материнский и отцовский геномы не могут функционировать отдельно друг от друга.

Только двух родительских генома, объединившиеся в зиготе, обеспечивают зарождение молекулярной жизни, появление нового качественного состояния - одного из свойств биологической материи.

На рис. 23 отражены результаты взаимодействия двух родительских геномов при оплодотворении гамет.

Согласно формуле оплодотворения: зигота = яйцеклетка + сперматозоид, начало развития зиготы - это момент формирования двойного (диплоидного) при встрече двух гаплоидных наборов родительских гамет. Именно тогда зарождается молекулярная жизнь и запускается цепь последовательных реакций на основе сначала экспрессии генов генотипа зиготы, а затем генотипов появившихся из нее дочерних соматических клеток. Отдельные гены и группы генов в составе генотипов всех клеток организма начинают «включаться» и «выключаться» в ходе реализации генетической программы онтогенеза.

Ведущая роль в происходящих событиях принадлежит яйцеклетке, имеющей в ядре и цитоплазме все необходимые для зарожде-

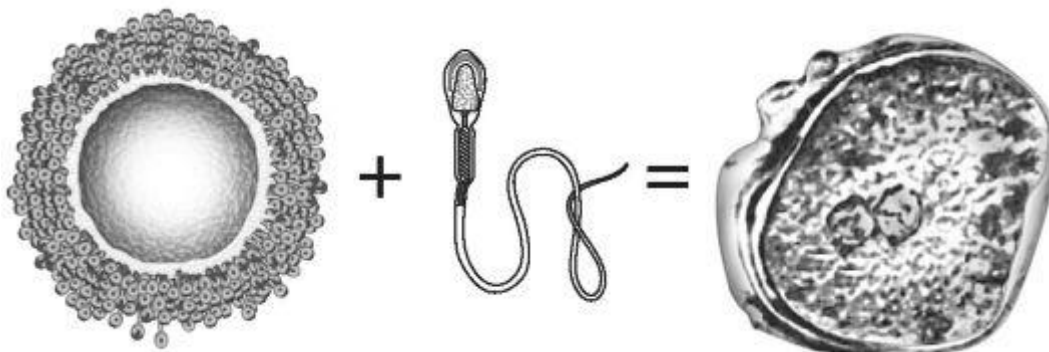


Рис.

23. Результаты взаимодействия двух родительских геномов при оплодотворении гамет (рисунки по www.bio.1september.ru; www.bio.fizteh.ru; www.vetfac.nsau.edu.ru соответственно)

ния и продолжения жизни структурные и функциональные компоненты ядра и цитоплазмы (суть *биологического матриархата*). Сперматозоид же содержит ДНК и не содержит компонентов цитоплазмы. Проникнув в яйцеклетку, ДНК сперматозоида вступает в контакт с ее ДНК, и тем самым в зиготе «включается» функционирующий в течение всей жизни организма главный молекулярный механизм: ДНК-ДНК взаимодействие двух родительских геномов. Строго говоря, активизируется генотип, представленный примерно равными частями нуклеотидных последовательностей ДНК материнского и отцовского происхождения (без учета мтДНК цитоплазмы). Упростим сказанное: начало молекулярной жизни в зиготе - нарушение постоянства внутренней среды яйцеклетки (ее гомеостаза), а вся последующая молекулярная жизнь многоклеточного организма - стремление восстановить подверженный действию факторов среды гомеостаз или баланс между двумя противоположными состояниями:

стабильностью с *одной стороны* и изменчивостью с *другой*. Таковы причинно-следственные связи, определяющие возникновение и непрерывность молекулярной жизни организма в ходе онтогенеза.

Теперь обратим внимание на результаты и значение изменчивости генома организма как продукта эволюции. Сначала рассмотрим вопрос об уникальности генотипа зиготы или клетки-родоначальницы всех клеток, тканей, органов и систем организма.

Само оплодотворение происходит случайно: одну женскую гамету оплодотворяет только одна мужская гамета из 200-300 млн сперматозоидов, содержащихся в эякуляте мужчины. Очевидно, что каждую яйцеклетку и каждый сперматозоид отличают друг от друга многие генотипические и фенотипические признаки: наличие измененных или неизмененных по составу и комбинациям генов (результаты комбинативной изменчивости), разные последовательности нуклеотидных последовательностей ДНК, разные размеры, форма, функциональная активность (подвижность), зрелость гамет и др. Именно эти отличия позволяют говорить об уникальности генома любой гаметы и, следовательно, генотипа зиготы и всего организма: случайность оплодотворения гамет обеспечивает появление на свет генетически уникального организма индивида.

Иными словами, молекулярная жизнь человека (как и жизнь биологического существа вообще) - «дар судьбы» или, если угодно, «божественный дар», ибо вместо данного индивида с одинаковой

вероятностью могли родиться генетически иные - его родные братья и сестры.

Теперь продолжим наши рассуждения о балансе между стабильностью и изменчивостью наследственного материала. В широком смысле, поддержание такого баланса - это одновременное сохранение и изменение (преобразование) стабильности наследственного материала под действием внутренних (гомеостаз) и внешних средовых факторов (норма реакции). Гомеостаз зависит от генотипа, обусловленного слиянием двух геномов (см. рис. 23). Норма реакции определяется взаимодействием генотипа с факторами окружающей среды.

Норма и диапазон реакции

Специфический способ реакции организма в ответ на действие факторов окружающей среды называется нормой реакции. Именно гены и генотип ответственны за развитие и диапазон модификаций отдельных признаков и фенотипа всего организма. Вместе с тем, в фенотипе реализуются далеко не все возможности генотипа, т.е. фенотип - частный (для индивида) случай реализации генотипа в конкретных условиях окружающей среды. Поэтому, например, между монозиготными близнецами, имеющими полностью идентичные генотипы (100% общих генов), выявляются заметные фенотипические различия, если близнецы растут в разных условиях окружающей среды.

Норма реакции бывает узкой или широкой. В первом случае стабильность отдельного признака (фенотипа) сохраняется практически вне зависимости от влияния окружающей среды. Примерами генов с узкой нормой реакции или непластичных генов служат гены, кодирующие синтез антигенов групп крови, окраску глаз, курчавость волос и др. Их действие одинаково при любых (совместимых с жизнью) внешних условиях. Во втором случае стабильность отдельного признака (фенотипа) изменяется в зависимости от влияния окружающей среды. Пример генов с широкой нормой реакции или пластичных генов - гены, контролирующие количество эритроцитов крови (разное у лиц, поднимающихся в гору, и лиц, спускающихся с горы). Другой пример широкой нормы

реакции - изменение окраски кожных покровов (загар), связанный с интенсивностью и временем воздействия на организм ультрафиолетового облучения.

Говоря о диапазоне реакции, следует иметь в виду фенотипические различия, проявляющиеся у индивида (его генотипа) в зависимости от

«обедненных» или «обогащенных» условий окружающей среды, в которых находится организм. Согласно определению И.И. Шмальгаузена (1946), «наследуются не признаки, как таковые, а норма их реакции на изменения условий существования организмов».

Таким образом, норма и диапазон реакции - это пределы генотипической и фенотипической изменчивости организма при изменении условий окружающей среды.

Следует также отметить, что из внутренних факторов, оказывающих влияние на фенотипическое проявление генов и генотипа, определенное значение имеют пол и возраст индивида.

Внешние и внутренние факторы, определяющие развитие признаков и фенотипов, входят в указанные в главе три группы основных факторов, среди которых гены и генотип, механизмы межмолекулярных (ДНК-ДНКовых) и межгенных взаимодействий между родительскими геномами и факторы окружающей среды.

Безусловно, основой приспособления организма к условиям окружающей среды (основой онтогенеза) является его генотип. В частности, индивиды с генотипами, не обеспечивающими подавление отрицательного действия патологических генов и факторов среды, оставляют меньше потомков, чем те индивиды, у которых нежелательные эффекты подавляются.

Вероятно, что в генотипы более жизнеспособных организмов включены специальные гены (гены-модификаторы), подавляющие действие «вредных» генов таким образом, что вместо них доминантными становятся аллели нормального типа.

НЕНАСЛЕДСТВЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Говоря о ненаследственной изменчивости генетического материала, снова рассмотрим пример широкой нормы реакции - изменение окраски кожных покровов под действием ультрафиолетового излучения. «Загар» ведь не передается из поколения в поколение, т.е. не наследуется, хотя в его возникновении участвуют пластичные гены.

Точно так же не наследуются результаты травм, рубцовые изменения тканей и слизистых оболочек при ожоговой болезни, обморожениях, отравлениях и многие другие признаки, вызванные действием исключительно факторов среды. Вместе с тем, следует подчеркнуть: ненаследственные изменения или модификации связаны с наслед-

ственными свойствами данного организма, ибо образуются на фоне конкретного генотипа в конкретных условиях окружающей среды.

Наследственная комбинативная изменчивость

Как сказано в начале главы, кроме механизма случайных встреч гамет при оплодотворении, комбинативная изменчивость включает механизмы кроссинговера в первом делении мейоза и независимого расхождения хромосом к полюсам деления при образовании дочерних клеток в ходе митоза и мейоза (см. главу 9).

Кроссинговер в первом делении мейоза

За счет механизма кроссинговера сцепление генов с хромосомой регулярно нарушается в профазе первого деления мейоза в результате перемешивания между собой (обмена) генов отцовского и материнского происхождения (рис. 24).

В начале XX в. при открытии кроссинговера Т.Х. Морган и его ученики предположили: кроссинговер между двумя генами может происходить не только в одной, но и в двух, трех (соответственно двойной и тройной кроссинговер) и большем количестве точек. Отмечалось подавление кроссинговера в участках, непосредственно примыкающих к точкам обмена; такое подавление называли интерференцией.

В конечном итоге подсчитали: на один мужской мейоз приходится от 39 до 64 хиазм или рекомбинаций, а на один женский мейоз - до 100 хиазм.

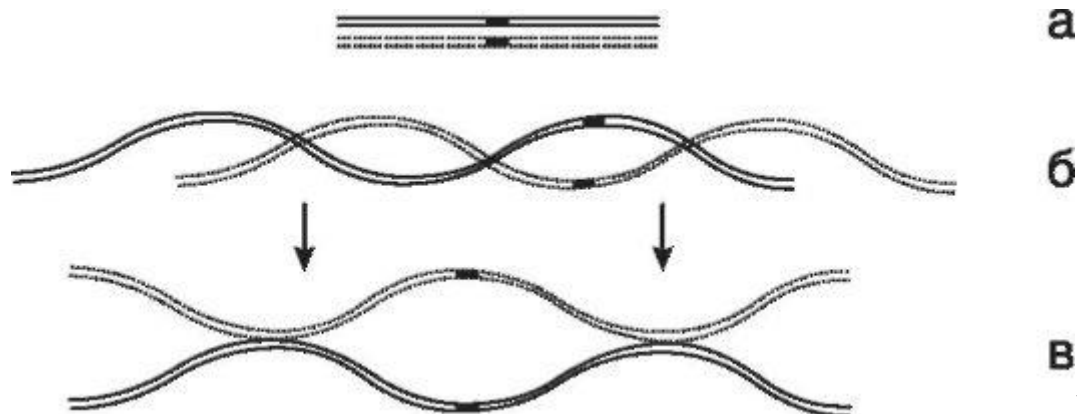


Рис.

24. Схема кроссинговера в первом делении мейоза (по Шевченко В.А. и соавт., 2004):

а - сестринские хроматиды гомологичных хромосом до начала мейоза; б - они же во время пахитены (видна их спирализация); в - они же во время диплотены и диакинеза (стрелки указывают на места кроссинговера-хиазмы, или участки обмена)

В результате сделали вывод: сцепление генов с хромосомами постоянно нарушается в ходе кроссинговера.

Факторы, влияющие на кроссинговер

Кроссинговер - один из регулярных генетических процессов в организме, контролируемый многими генами как непосредственно, так и через физиологическое состояние клеток в ходе мейоза и даже митоза.

К факторам, влияющим на кроссинговер, относятся:

- гомо- и гетерогаметный пол (речь идет о *митотическом кроссинговере* у самцов и самок таких эукариот, как дрозофила и тутовый шелкопряд); так, у дрозофилы кроссинговер протекает нормально; у тутового шелкопряда - либо тоже нормально, либо отсутствует; у человека следует обратить внимание на смешанный («третий») пол и конкретно на роль кроссинговера при аномалиях развития пола при мужском и женском гермафродитизме (см. главу 16);
- структура хроматина; на частоту кроссинговера в разных участках хромосом влияет распределение гетерохроматиновых (прицентромерные и теломерные участки) и эухроматиновых районов; в частности, в прицентромерных и теломерных участках частота кроссинговера снижена, и расстояние между генами, определяемое по частоте кроссинговера, может не соответствовать фактическому;

- функциональное состояние организма; по мере увеличения возраста меняется степень спирализации хромосом и скорость клеточного деления;
- генотип; в его составе выделены гены, увеличивающие или уменьшающие частоту кроссинговера; «запиратели» последнего - хромосомные перестройки (инверсии и транслокации), затрудняющие нормальную конъюгацию хромосом в зиготене;
- экзогенные факторы: воздействие температуры, ионизирующей радиации и концентрированных растворов солей, химические мутагены, лекарства и гормоны, как правило, повышающие частоту кроссинговера.

По частоте мейотического и митотического кроссинговера и СХО порой судят о мутагенном действии лекарств, канцерогенов, антибиотиков и других химических соединений.

Неравный кроссинговер

В редких случаях в ходе кроссинговера наблюдаются разрывы в несимметричных точках сестринских хроматид, и они обменива-

ются между собой неравными участками - это неравный кроссинговер.

Вместе с тем, описаны случаи, когда в ходе митоза наблюдается митотическая конъюгация (неправильное спаривание) гомологичных хромосом и рекомбинация происходит между несестринскими хроматидами. Такое явление получило название *генной конверсии*.

Значение данного механизма трудно переоценить. Например, в результате неправильного спаривания гомологичных хромосом по фланкирующим повторам может произойти удвоение (дупликация) или утрата (делеция) участка хромосомы, содержащего ген RMP22, что обусловит развитие наследственной аутосомно-доминантной моторно-сенсорной нейропатии Шарко-Мари-Тус.

Неравный кроссинговер - один из механизмов возникновения мутаций. Например, периферический белок миелин кодируется геном RMP22, расположенным в хромосоме 17 и имеющим длину около 1,5 млн н.п. Этот ген фланкируется двумя гомологичными повторами длиной около 30 тыс. н.п. (повторы расположены на флангах гена).

Особенно много мутаций в результате неравного кроссинговера происходит в псевдогенах. Тогда либо фрагмент одного аллеля переносится в другой аллель, либо фрагмент псевдогена - в ген. Например, подобная мутация отмечается при переносе последовательности псевдогена в ген 21-гидроксилазы (CYP21B) при адреногенитальном синдроме или врожденной гиперплазии коры надпочечников (см. главы 14 и 22).

Кроме того, за счет рекомбинаций в ходе неравного кроссинговера могут образовываться множественные аллельные формы генов, кодирующих антигены HLA класса I.

Независимое расхождение гомологических хромосом к полюсам деления при образовании дочерних клеток в ходе митоза и мейоза

Благодаря процессу репликации, предшествующему митозу соматической клетки, общее количество нуклеотидных последовательностей ДНК увеличивается вдвое. Формирование одной пары гомологичных хромосом происходит из двух отцовских и двух материнских хромосом. При распределении этих четырех хромосом в две дочерние клетки каждая из клеток получит одну отцовскую и одну материнскую хромосомы (для каждой пары

хромосомного набора), однако какую именно из двух, первую или вторую, неизвестно. Имеет место

случайный характер распределения гомологичных хромосом. Легко подсчитать: за счет различных комбинаций 23 пар хромосом общее количество дочерних клеток составит 2^{23} , или более 8 млн (8×10^6) вариантов комбинаций хромосом и расположенных на них генов. Следовательно, при случайном характере распределения хромосом в дочерние клетки каждая из них будет иметь свой уникальный кариотип и генотип (свой вариант комбинации хромосом и сцепленных с ними генов соответственно). Следует отметить и возможность патологического варианта распределения хромосом в дочерние клетки. Например, попадание в одну из двух дочерних клеток только одной (отцовской или материнской по происхождению) X-хромосомы приведет к моносомии (синдром Шерешевского-Тернера, кариотип 45, XO), попадание трех одинаковых аутосом приведет к трисомии (синдромы Дауна, 47,XY,+21; Патау, 47,XX,+13 и Эдвардса, 47,XX,+18; см. также главу 2).

Как отмечено в главе 5, в одну дочернюю клетку могут одновременно попасть две отцовские или две материнские по происхождению хромосомы - это однородительская изодисомия по конкретной паре хромосом: синдромы Сильвера-Рассела (две материнские хромосомы 7), Беквитта-Видемана (две отцовские хромосомы 11), Ангельмана (две отцовские хромосомы 15), Прадера-Вилли (две материнские хромосомы 15). В целом объем нарушений распределения хромосом достигает 1% всех хромосомных нарушений у человека. Эти нарушения имеют большое эволюционное значение, ибо создают популяционное разнообразие кариотипов, генотипов и фенотипов человека. Причем каждый патологический вариант является уникальным продуктом эволюции.

В случае мейоза также легко подсчитать: после первого деления общее число возможных типов комбинаций хромосом в дочерних клетках составит 2^{23} или более 8 млн генотипов.

В результате второго мейотического деления образуются 4 дочерние клетки. В каждую из них отойдет по одной либо материнской, либо отцовской хромосоме из всех 23 хромосом.

Чтобы избежать возможных ошибок в наших дальнейших расчетах, примем за правило: в результате второго мейотического деления также образуется 8 млн вариантов мужских гамет и 8 млн вариантов женских гамет. Тогда ответ на вопрос, каков общий объем вариантов комбинаций хромосом и расположенных на них генов при встрече двух гамет, следующий: 2^{46} или 64×10^{12} , т.е. 64 триллиона.

Образование такого (теоретически возможного) количества генотипов при встрече двух гамет наглядно объясняет смысл гетерогенности генотипов.

Значение комбинативной изменчивости

Комбинативная изменчивость важна не только для гетерогенности и уникальности наследственного материала, но и для восстановления (репарации) стабильности молекулы ДНК при повреждении ее обеих нитей. Примером служит образование одноцепочечной брешы ДНК напротив нерепарированного повреждения. Появившаяся брешь не может быть безошибочно исправлена без привлечения к репарации нормальной нити ДНК.

Мутационная изменчивость

Наряду с уникальностью и гетерогенностью генотипов и фенотипов в результате комбинативной изменчивости огромный вклад в вариабельность генома и фенома человека вносит наследственная мутационная изменчивость и обусловленная ею генетическая гетерогенность.

Вариации нуклеотидных последовательностей ДНК чисто условно можно разделить на мутации и генетический полиморфизм (см. главу 2). Вместе с тем, если гетерогенность генотипов - это постоянные (нормальные) характеристики вариабельности генома, то мутационная изменчивость - это, как правило, его патология.

В пользу патологической вариабельности генома свидетельствуют, например, неравный кроссинговер, неправильное расхождение хромосом к полюсам деления при образовании дочерних клеток, наличие генетических компаундов и аллельных серий. Иными словами, наследственная комбинативная и мутационная изменчивость проявляется у человека значительным генотипическим и фенотипическим разнообразием.

Уточним терминологию и рассмотрим общие вопросы теории мутаций.

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ТЕОРИИ МУТАЦИЙ

Мутация есть изменение структурной организации, количества и/или функционирования наследственного материала и синтезируемых им белков. Это понятие впервые предложил Гуго де Фриз

в 1901-1903 гг. в своей работе «Мутационная теория», где описал основные свойства мутаций. Они:

- возникают внезапно;
- передаются из поколения в поколение;
- наследуются по доминантному типу (проявляются у гетерозигот и гомозигот) и рецессивному типу (проявляются у гомозигот);
- не имеют направленности («мутирует» любой локус, вызывая незначительные изменения или затрагивая жизненно важные признаки);
- по фенотипическому проявлению бывают вредными (большинство мутаций), полезными (крайне редко) или безразличными;
- возникают в соматических и половых клетках.

Кроме того, одни и те же мутации могут возникнуть повторно.

Мутационный процесс или мутагенез, есть непрерывно идущий процесс формирования мутаций под действием мутагенов - факторов среды, повреждающих наследственный материал.

Впервые *теория непрерывно идущего мутагенеза* предложена в 1889 г. русским ученым из Петербургского университета С.И. Коржинским в его книге «Гетерогенезис и эволюция».

Как принято считать в настоящее время, мутации способны проявиться спонтанно, без видимых внешних причин, но под влиянием внутренних условий в клетке и организме - это спонтанные мутации или спонтанный мутагенез.

Мутации, вызванные искусственно путем воздействия внешних факторов физической, химической или биологической природы, - это индуцированные мутации, или индуцированный мутагенез.

Наиболее часто встречающиеся мутации называются мажорными мутациями (например, мутации в генах миодистрофии Дюшенна- Беккера, муковисцидоза, серповидноклеточной

анемии, фенилкетонурии и др.). Сейчас созданы коммерческие наборы, позволяющие выявлять в автоматическом режиме наиболее важные из них.

Вновь возникшие мутации называются новыми мутациями или мутациями *de novo*. Например, к ним относятся мутации, лежащие в основе ряда аутосомно-доминантных болезней, таких, как ахондроплазия (10% случаев заболевания - семейные формы), нейрофиброматоз Реклингаузена I типа (50-70% - семейные формы), болезнь Альцгеймера, хорея Гентингтона.

Мутации от нормального состояния гена (признака) к патологическому состоянию называются прямыми.

Мутации от патологического состояния гена (признака) к нормальному состоянию называются обратными или реверсиями.

Впервые способность к реверсии установлена в 1935 г. Н.В. Тимофеевым-Рессовским.

Последующие мутации в гене, подавляющие первичный мутантный фенотип, называются супрессорными. Супрессия может быть *внутригенной* (восстанавливает функциональную активность белка; аминокислота не соответствует исходной, т.е. истинной обратимости нет) и *внегенной* (изменяется структура тРНК, в результате чего мутантная тРНК включает в полипептид другую аминокислоту вместо кодируемой дефектным триплетом).

Мутации в соматических клетках называются соматическими мутациями. Они формируют патологические клеточные клоны (совокупность патологических клеток) и в случае одновременного присутствия в организме нормальных и патологических клеток приводят к клеточному мозаицизму (например, при наследственной остеодистрофии Олбрайта экспрессивность заболевания зависит от количества аномальных клеток).

Соматические мутации могут быть как семейными, так и спорадическими (несемейными). Они лежат в основе развития злокачественных новообразований и процессов преждевременного старения.

Ранее считалось аксиомой, что соматические мутации не наследуются. В последние же годы была доказана передача из поколения в поколение наследственной предрасположенности 90% мультифакториальных форм и 10% моногенных форм рака, проявляющихся мутациями в соматических клетках.

Мутации в половых клетках называются герминативными мутациями. Считается, что они встречаются реже соматических мутаций, лежат в основе всех наследственных и некоторых врожденных болезней, передаются из поколения в поколение и также могут быть семейными и спорадическими. Наиболее изученная область общего мутагенеза - физический и, в частности, радиационный мутагенез. Любые источники ионизирующей радиации пагубны для здоровья человека, они, как правило, оказывают мощное мутагенное, тератогенное и канцерогенное воздействие. Мутагенный эффект однократной дозы облучения гораздо выше, чем при хроническом облучении; доза облучения в 10 рад удваивает частоту мутаций у человека. Доказано: ионизирующее излучение способно вызвать мутации, приводящие

к наследственным (врожденным) и онкологическим болезням, а ультрафиолетовое - индуцировать ошибки репликации ДНК.

Большую опасность представляет химический мутагенез. В мире существует около 7 млн химических соединений. В народном хозяйстве, на производстве и в быту постоянно

применяются примерно 50-60 тыс. химических веществ. Ежегодно внедряются в практику около одной тысячи новых соединений. Из них 10% в состоянии индуцировать мутации. Таковы гербициды и пестициды (доля мутагенов среди них достигает 50%), а также ряд лекарственных препаратов (некоторые антибиотики, синтетические гормоны, цитостатики и др.).

Существует еще биологический мутагенез. К биологическим мутагенам относятся: чужеродные белки вакцин и сывороток, вирусы (ветряная оспа, коревая краснуха, полиомиелит, простой герпес, СПИД, энцефалит) и ДНК, экзогенные факторы (неполноценное белковое питание), соединения гистамина и его производные, стероидные гормоны (эндогенные факторы). Усиливают действие внешних мутагенов комутагены (токсины).

В истории генетики немало примеров значения связей между генами и признаками. Один из них - классификация мутаций в зависимости от их фенотипического эффекта.

Классификация мутаций в зависимости от их фенотипического эффекта

Такую классификацию мутаций впервые предложил в 1932 г. Г. Мёллер. Согласно классификации были выделены:

- аморфные мутации. Это состояние, при котором признак, контролируемый патологическим аллелем, не проявляется, так как патологический аллель не активен по сравнению с нормальным аллелем. К таким мутациям относятся ген альбинизма (11q14.1) и около 3000 аутосомно-рецессивных заболеваний;
- антиморфные мутации. В этом случае значение признака, контролируемого патологическим аллелем, противоположно значению признака, контролируемого нормальным аллелем. К таким мутациям относятся гены около 5-6 тыс. аутосомно-доминантных заболеваний;
- гиперморфные мутации. В случае такой мутации признак, контролируемый патологическим аллелем, выражен сильнее признака, контролируемого нормальным аллелем. Пример - гете-

розиготные носители генов болезней нестабильности генома (см. главу 10). Их число составляет около 3% населения Земли (почти 195 млн человек), а количество самих заболеваний достигает 100 нозологий. Среди этих заболеваний: анемия Фанкони, атаксиятелеангиэктазия, пигментная ксеродерма, синдром Блума, прогероидные синдромы, многие формы рака и др. При этом частота рака у гетерозиготных носителей генов этих заболеваний в 3-5 раз выше, чем в норме, а у самих больных (гомозигот по этим генам) частота рака в десятки раз выше, чем в норме.

- Гипоморфные мутации. Это состояние, при котором проявление признака, контролируемого патологическим аллелем, ослаблено по сравнению с признаком, контролируемым нормальным аллелем. К таким мутациям относятся мутации генов синтеза пигментов (1q31; 6p21.2; 7p15-q13; 8q12.1; 17p13.3; 17q25; 19q13; Xp21.2; Xp21.3; Xp22), а также более 3000 форм аутосомно-рецессивных заболеваний.

- Неоморфные мутации. О такой мутации говорят, когда признак, контролируемый патологическим аллелем, будет иного (нового) качества по сравнению с признаком, контролируемым нормальным аллелем. Пример: синтез новых иммуноглобулинов в ответ на проникновение в организм чужеродных антигенов.

Говоря о непреходящем значении классификации Г. Мёллера, следует отметить, что спустя 60 лет после ее публикации фенотипические эффекты точковых мутаций были разделены на разные классы в зависимости от оказываемого ими воздействия на структуру белкового продукта гена и/или уровень его экспрессии.

В частности, нобелевский лауреат Виктор Маккьюсик (1992) выделил мутации, изменяющие последовательность аминокислот в белке. Оказалось, что именно они отвечают за проявление 50-60% случаев моногенных болезней, а остальные мутации (40-50% случаев) приходится на долю мутаций, затрагивающих экспрессию генов.

Изменение аминокислотного состава белка проявляется в патологическом фенотипе, например, в случаях метгемоглобинемии или серповидноклеточной анемии, обусловленной мутациями бетаглобинового гена. В свою очередь, были выделены мутации, затрагивающие нормальную экспрессию гена. Они приводят к изменению количества генного продукта и проявляются фенотипами, связанными с недостаточностью того или иного белка, например,

в случаях *гемолитической анемии*, обусловленной мутациями генов, локализованных на аутосомах: 9q34.3 (дефицит аденилаткиназы); 12p13.1 (дефицит триозофосфатизомеразы); 21q22.2 (дефицит фосфофруктокиназы).

Классификация мутаций В. Маккьюсика (1992) - это, безусловно, новое поколение классификаций. Вместе с тем, накануне ее публикации широкое признание получила классификация мутаций в зависимости от уровня организации наследственного материала.

Классификация мутаций в зависимости от уровня организации наследственного материала

Классификация включает следующее.

Точковые мутации (нарушение структуры гена в разных его точках).

Строго говоря, к точковым мутациям относятся изменения нуклеотидов (оснований) одного гена, ведущие к изменению количества и качества синтезируемых ими белковых продуктов. Изменения оснований - это их замены, вставки, перемещения или выпадения, которые можно объяснить мутациями в регуляторных областях генов (промотор, сайт полиаденилирования), а также в кодирующих и некодирующих областях генов (экзоны и интроны, сайты сплайсинга). Замены оснований ведут к появлению трех типов мутантных кодонов: миссенс-мутации, нейтральные мутации и нонсенс-мутации.

Точковые мутации наследуются как простые менделевские признаки. Они часто встречаются: 1 случай на 200-2000 рождений - это первичный гемохроматоз, неполипозный рак толстой кишки, синдром Мартина-Белл и муковисцидоз.

Точковые мутации, встречающиеся крайне редко (1:1 500 000), - это тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД) в результате дефицита аденозиндезаминазы. Иногда точковые мутации формируются не при воздействии мутагенов, а как ошибки репликации ДНК. При этом их частота не превышает $1:10^5$ - $1:10^{10}$, так как они исправляются с помощью репарационных систем клетки почти на

99%.

Структурные мутации или абберрации хромосом (нарушают структуру хромосом и приводят к формированию новых групп сцепления генов). Это делеции (утраты), дупликации (удвоения), транслокации (перемещения), инверсии (поворот на 180°) или инсерции (вставки) наследственного материала. Такие мутации характерны для сомати-

ческих клеток (включая стволовые клетки). Их частота составляет 1 на 1700 клеточных делений.

Известен ряд синдромов, обусловленных структурными мутациями. Наиболее известные примеры: синдром «кошачьего крика» (кариотип: 46,XX,5p-), синдром Вольфа-Хиршхорна (46,XX, 4p-), транслокационная форма синдрома Дауна (кариотип: 47, XY, t(14;21)).

Другой пример - это лейкемии. При них происходит нарушение экспрессии гена в результате так называемого разделения (транслокация между структурной частью гена и его промоторной областью), и, следовательно, нарушается синтез белка.

Геномные (численные) мутации - нарушение числа хромосом или их частей (ведут к появлению новых геномов или их частей путем добавления или утраты целых хромосом или их частей). Происхождение этих мутаций обусловлено нерасхождением хромосом в митозе или мейозе.

В первом случае - это анеуплоиды, тетраплоиды с неразделенной цитоплазмой, полиплоиды, имеющие по 6, 8, 10 пар хромосом и более.

Во втором случае - это неразделение парных хромосом, участвующих в формировании гамет (моносомии, трисомии) или оплодотворение одной яйцеклетки двумя сперматозоидами (диспермия или триплоидный зародыш).

Их типичные примеры уже не раз приводились - это синдром Шерешевского-Тернера (45,ХО), синдром Клайнфельтера (47,XXY), регулярная трисомия при синдроме Дауна (47,XX,+21).

Геномные мутации являются наиболее частыми из всех классов мутаций, особенно синдром Дауна, частота которого составляет 1 случай на 550-650 человек.

Именно частота синдрома Дауна служит показателем общей частоты хромосомных и геномных мутаций в популяции человека. Существует правило, согласно которому среди 100 больных с разными хромосомными синдромами 95 больных (95%) будут иметь нарушения числа хромосом (включая 75% больных с синдромом Дауна) и только 5 больных (5%) - структурные нарушения хромосом.

В настоящее время в структурной геномике большое распространение получает классификация точковых мутаций в зависимости от размеров фрагментов ДНК, подвергающихся изменениям в ходе мутагенеза.

Причины уникальности мутаций и классификация точковых мутаций

Несмотря на наличие общих закономерностей мутационного процесса, структура и спектр мутационных повреждений каждого гена уникальны.

Причины уникальности мутаций скрыты в особенностях строения ДНК, включая:

- размеры гена;
- обогащенность гена ГЦ-парами; она предрасполагает к образованию точковых мутаций типа транзиции или замены цитозина на тимин в процессе метилирования-деметилирования;
- наличие в гене прямых и обратных (обращенных) повторов;

- наличие в генах последовательностей ДНК, гомологичных внегенным участкам, что может вызвать нарушение рекомбинации в мейозе;
- инсерции транспозонов (в Alu-, LINE- и SINE- последовательностях);
- динамические мутации транскрибируемых и нетранскрибируемых повторов.

Важно отметить, что точковые мутации каждого гена по своей локализации диаллельны: встречаются в двух вариантах в зависимости от отцовского или материнского происхождения (см. главу 2). Они могут затронуть любое звено на всем пути прохождения наследственной информации от молекулы ДНК к молекуле полипептида.

Согласно указанной выше классификации В. Маккьюсика (1992), среди точковых мутаций выделены мутации первого и второго типов.

Первый тип - это мутации транскрипции. Среди них:

- мутации в области промотора; примером служат два гена, характерных для синдромов Мартина-Белла и умственной отсталости, сцепленных с хрупкой X-хромосомой, - это гены FraXA и FraXE; другой пример - это мутация фактора IX (положение 20 от старта транскрипции) при гемофилии В;

В настоящее время в структурной геномике большое распространение получает классификация точковых мутаций в зависимости от размеров фрагментов ДНК, подвергающихся изменениям в ходе мутагенеза.

Причины уникальности мутаций и классификация точковых мутаций

Несмотря на наличие общих закономерностей мутационного процесса, структура и спектр мутационных повреждений каждого гена уникальны.

Причины уникальности мутаций скрыты в особенностях строения ДНК, включая:

- размеры гена;
- обогащенность гена ГЦ-парами; она предрасполагает к образованию точковых мутаций типа транзиции или замены цитозина на тимин в процессе метилирования-деметиления;
- наличие в гене прямых и обратных (обращенных) повторов;
- наличие в генах последовательностей ДНК, гомологичных внегенным участкам, что может вызвать нарушение рекомбинации в мейозе;
- инсерции транспозонов (в Alu-, LINE- и SINE- последовательностях);
- динамические мутации транскрибируемых и нетранскрибируемых повторов.

Важно отметить, что точковые мутации каждого гена по своей локализации диаллельны: встречаются в двух вариантах в зависимости от отцовского или материнского происхождения (см. главу 2). Они могут затронуть любое звено на всем пути прохождения наследственной информации от молекулы ДНК к молекуле полипептида.

Согласно указанной выше классификации В. Маккьюсика (1992), среди точковых мутаций выделены мутации первого и второго типов.

Первый тип - это мутации транскрипции. Среди них:

- мутации в области промотора; примером служат два гена, характерных для синдромов Мартина-Белл и умственной отсталости, сцепленных с хрупкой Х-хромосомой, - это гены FraXA и FraXE; другой пример - это мутация фактора IX (положение 20 от старта транскрипции) при гемофилии В;
- мутации сплайсинга мРНК, в том числе мутации в 5'-донорском и 3'-акцепторном сайтах интронов, а также мутации, приводящие к появлению новых сайтов сплайсинга из-за неправильного вырезания интрона или экзона; пример - мутация при муковисцидозе (621GT);
- мутации полиаденилирования;
- мутации кэп-сайта;
- мутации (делеции) энхансеров.

Второй тип мутаций - это мутации трансляции. Среди них выделяют следующие.

- Мутации кодона инициации транскрипции или индикаторного кодона (AUG), а также мутации вблизи этого кодона.
- Мутации в терминирующих кодонах - TAA, TAG и TGA (приводит к синтезу длинных белков).
- Мутации сдвига рамки считывания или фреймшифт-мутации (приводят к делеции или inserции участка молекулы ДНК, размеры которого не кратны трем нуклеотидам, и в результате нарушается нормальный отсчет кодирующих триплетов, возникают преждевременные стоп-кодона (ПСК) и наблюдается синтез неполноценных белков. Эти мутации встречаются при муковисцидозе (3905 insT) и лежат в основе многих нервно-мышечных заболеваний. Например, протяженные делеции, охватывающие весь ген или значительную его область, обнаружены при Х-сцепленной рецессивной миодистрофии Дюшенна-Бекера и аутосомно-рецессивных спинальных мышечных атрофиях.
- Миссенс-мутации или замена одного аминокислотного остатка на другой в молекуле белка. Эти мутации приводят к нарушению экспрессии гена и, следовательно, к образованию новой структуры белка, которая может оказаться нестабильной; так, например, миссенс-мутация в кодоне 553 гена FAS ведет к замене лейцина на пролин, что делает продуцируемый геном белок неспособным компенсировать функциональный дефект в клетках больных с анемией Фанкони.
- Молчащая (нейтральная) мутация; такая мутация не сопровождается регистрируемым изменением признака и фенотипа; например, не всякая замена аминокислоты отражается на функциональной активности белка, т.е. она может оказаться нейтральной.
- Нонсенс-мутации или замены нуклеотидов, приводящие к замене информационно значимого кодона на стоп-кодон и, следовательно, к остановке синтеза белка или образованию укороченного белка. Эти мутации в большинстве случаев оказывают значительное повреждающее действие, и из-за преждевременного окончания трансляции они не способны к модификации, часто не защищены от действия протеолитических ферментов и быстро

деградируют. Однако на их долю приходится примерно одна треть всех моногенных заболеваний.

Примером служит нонсенс-мутация в третьем (последнем) экзоне гена бета-глобина, которая не вызывает процесс NMD (см. главу 7) в связи с отсутствием экзон-экзонного соединения и ведет к синтезу укороченного бета-глобина (он не может нормально связываться с альфа-глобином), что обуславливает доминантную форму талассемии. При нонсенс-мутации, приводящей к появлению преждевременного стоп-кодона в первом или втором экзонах, возникает рецессивная форма талассемии.

Нонсенс-мутации с появлением преждевременного стоп-кодона и мутация со сдвигом рамки считывания показаны соответственно для генов альфа-1-антитрипсина и аполипопротеина (ApoB1).

Другой пример - это нонсенс-мутация при муковисцидозе, приводящая к блоку синтеза полноразмерного белка - G542X.

- Нулевая мутация, приводящая к отсутствию синтеза функционально значимого генного продукта.
- Регуляторная мутация, затрагивающая регуляторные последовательности гена и нарушающая его экспрессию (см. главу 28).

ГЛАВА 6 КЛЕТКА КАК СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЕДИНИЦА ОРГАНИЗМА

Все эукариоты состоят из клеток, межклеточных соединений, тканей, органов и систем.

Клетка - это структурная и функциональная единица живой материи, и именно из ее структурных компонентов и связывающих их между собой органических и неорганических соединений и материалов построено «здание» как самой клетки, так и всего многоклеточного организма.

Организационная структура клетки и ее органеллы

Клетка окружена плазматической мембраной, которая отделяет внутреннюю среду от внешней среды, удерживает вместе все внутриклеточные компоненты и обеспечивает поступление внутрь или выведение наружу различных химических соединений.

На рис. 25 приведена схема организационной структуры клетки и ее органеллы.

В клетке выделяют ядро, цитоплазму и цитоскелет.

Ядро, или центральная часть клетки, окружено двойной мембраной. Оно представляет собой своеобразный «штаб» или пульт управления. В нем находится основная часть молекулы ДНК, и про-



Рис. 25. Схематичное изображение клетки и ее органелл (по В. Эллиот, Эллиот Д., 2002)

исходят синтез (репликация) ядерной ДНК, образование мРНК, ее процессинг и сплайсинг.

Цитоплазма содержит другие части клетки, необходимые для ее жизнеобеспечения. Синтезируемые в цитоплазме специфические молекулы поступают в клеточное ядро через специальные поры (белки-каналы). Для этого используются короткие аминокислотные фрагменты или сигнальные последовательности, которых, например, нет у небольших ядерных белков-гистонов. В случае доставки в ядро факторов транскрипции такие фрагменты могут находиться внутри полипептидных цепочек.

Цитоскелет или каркас клетки, - это внутриклеточные перегородки из белковых волокон, пронизывающих всю цитоплазму и во многих точках связанных с внутриклеточными мембранами, отграничивающими друг от друга отдельные органеллы клетки.

Каркасные белки (белки цитоскелета) не способны к латеральной диффузии, свойственной белкам наружной мембраны, отграничивающей клетку от окружающей внешней среды.

Подробно рассмотрим органеллы цитоплазмы клетки, которые изолированы друг от друга собственными мембранами. Среди этих органелл выделяются следующие.

Эндоплазматический ретикулум (ЭР) или эндоплазматическая мембранная система.

ЭР - это основная структура цитоплазмы, занимающая половину объема клетки и представленная сетью мембранных трубочек и цистерн - так называемый *гладкий ретикулум*.

Здесь происходит синтез всех мембранных и секреторных белков и других веществ, которые доставляются в аппарат Гольджи либо подготавливаются к выведению из клетки. При этом структурные и регуляторные белки синтезируются в рибосомах, также расположенных в ЭР, но это уже так называемый *шероховатый ретикулум* (ШР).

Синтезируемые в рибосомах регуляторные белки-ферменты (и ферментные системы) концентрируются в других органеллах цитоплазмы: лизосомах, пероксисомах.

Аппарат Гольджи (АГ) - это стопки уплощенных цистерн, в которых накапливаются синтезируемые в ЭР соединения, заключенные в отпочковывающиеся (окруженные мембранами) пузырьки разного калибра, попадающие либо в лизосомы, либо в пероксисомы. Причем некоторые пузырьки возвращаются обратно в ШР, например фермент протеиндисульфатизомераза, участвующий в гликозилирова-

нии (см. ниже). Таким образом, АГ в определенном смысле служит сортировочным центром по рассылке внутриклеточной «молекулярной почты».

При этом рассылаемые из АГ разные ферменты обладают способностью «узнавать» в цитоплазме именно свои специфические структуры, например, лизосомные ферменты узнают лизосомы и фосфорилируют маннозу в их олигосахаридной части.

Лизосомы - это крупные пузырьки, содержащие высокоактивные гидролитические ферменты, расщепляющие различные макромолекулы клетки, включающие как собственные (нежелательные для клетки) соединения, так и ксенобиотики. При этом гидролитическая активность лизосомных ферментов столь высока, что если бы мембрана лизосом разрушилась под их действием, то клетка сразу же подверглась бы самоперевариванию.

В случае наследственных дефектов строения и функционирования лизосом развиваются лизосомные болезни. Например, из-за нарушения процесса деградации мукополисахаридов последние будут накапливаться в лизосомах, что обусловит развитие болезни I-клеток.

Выделено 44 нозологии лизосомных болезней или болезней накопления (см. главу 21).

Пероксисомы - это средние по размерам пузырьки (мельче лизосом), содержащие ферменты, обеспечивающие окислительные реакции в клетке. Например, пероксисомы участвуют в деградации белков (см. главу 3). Следует отметить, что и лизосомы, и пероксисомы условно можно отнести к органеллам, «перерабатывающим отходы жизнедеятельности» клетки. В случае наследственных дефектов строения и функционирования пероксисом развиваются пероксисомные болезни. Среди них выделено не менее 17 нозологий (см. главу 26).

Митохондрии - это органеллы, предназначенные для энергетического метаболизма. В их внутренней мембране образуется большинство энергетических молекул (в основном аденозинтрифосфат или АТФ), т.е. митохондрии выступают в роли производителей энергии или своего рода «электростанций», обеспечивающих энергией клеточные нужды.

Митохондрии служат источником активных форм кислорода (АФК), которые в случае их гиперпродукции и нарушения клеточного гомеостаза приводят к повреждению и даже гибели клетки (см. главу 11).

В случае наследственных дефектов строения и функционирования митохондрий развиваются митохондриальные болезни, в их числе насчитывается свыше 200 нозологий (см. главу 26).

Следует заметить, что если о лизосомных болезнях известно давно, то первые сообщения о пероксисомных и митохондриальных болезнях появились сравнительно недавно: в ходе реализации международной научной программы «Геном человека» (см. главу 1).

Примерно тогда же эти три класса заболеваний получили название болезней материнского наследования, потому что они передаются из поколения в поколение вместе с органеллами цитоплазмы яйцеклетки, т.е. исключительно по линии мать-дочь (см. главу 4).

Завершая рассмотрение организации и функционирования основных органелл цитоплазмы соматической клетки, следует особо отметить наличие в организме уникальной клетки, не имеющей таких органелл, - это зрелый эритроцит. Данная клетка представляет собой двояковогнутый диск, что позволяет увеличить поверхность газообмена между

цитоплазмой эритроцита и окружающей средой, придает ему гибкость и упругость, и поэтому эритроцит легко проходит по капиллярам.

Такую способность обеспечивает эритроциту белок - спектрин, связанный с якорным белком - анкирином, который в свою очередь связан с белком внутренней поверхности мембраны - гликофоорином, отвечающим за транспорт анионов.

В протеомике выделен наследственный дефект структуры спектрина или *наследственный эллиптоцитоз* (сфероцитоз), когда эритроциты имеют необычную форму и поэтому у них нарушена способность к прохождению через капилляры (такие эритроциты разрушаются в селезенке).

Кроме того, нарушение способности эритроцитов к прохождению через капилляры в результате их «засахаривания» наблюдается при сахарном диабете.

Химический состав структурных компонентов клеток, межклеточных соединений и тканей

Клетки, межклеточные соединения и ткани состоят из одних и тех же химических веществ.

Прежде всего, это вода (H_2O), на долю которой приходится около 70-90% общего состава химических веществ, и поэтому свойства клеток и тканей во многом определяются физическими и химическими свойствами воды.

В воде растворены соли основных химических элементов клетки: натрия, калия, кальция, магния и хлора.

Оставшаяся доля общего состава клетки - это органические вещества (10-30%), состоящие из атомов углерода (C), связанных с атомами водорода (H), кислорода (O_2), азота (N), серы (S) и фосфора (P).

Основное органическое вещество клетки - это углеводороды, соединения из двух атомов (C и H) с простой химической (ковалентной) связью между ними в виде одной пары электронов - по одному для каждого атома. Связь очень прочная, и чтобы ее разорвать, необходимо затратить много энергии.

Углеводороды - ценный вид биологического топлива, содержащего запасы энергии.

Все химические элементы клетки характеризуются валентностью, или способностью образовывать определенное количество химических связей (рис. 26).

В частности, валентность углерода равна четырем, поэтому каждый его атом может быть связан с четырьмя другими атомами. Благодаря этой особенности образуется большое количество комбинаций атомов, а в результате - значительное разнообразие органиче-

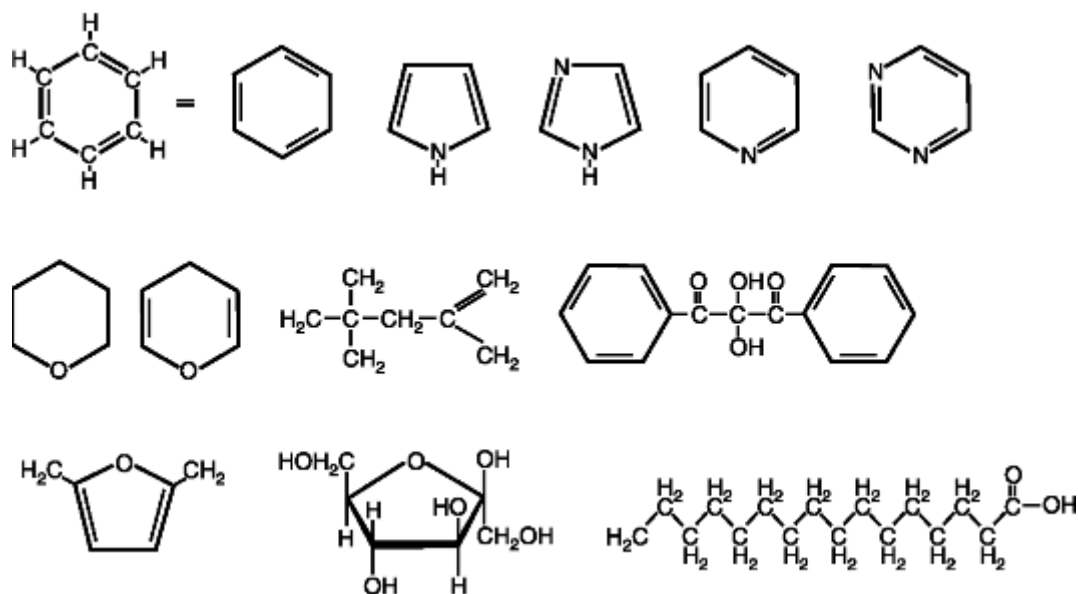


Рис.

26. Разнообразие органических молекул на основе атомов углерода, соединенных в цепи (по Гуттман Б. и соавт., 2004)

ских молекул. Например, в простых случаях, если к углеродной цепи присоединяется гидроксильная группа (HO), то образуется спирт, если аминогруппа (NH₂), то амин.

Более сложные молекулы органических соединений имеют кольца в виде замкнутых в них линий, в местах соединения которых атомы углерода обычно не обозначаются.

Наиболее важные из структурных компонентов служат «строительными материалами» для любой клетки. Среди них нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), белки, липиды и углеводы (информация о них изложена в соответствующих главах пособия). Эти структурные компоненты нередко отличаются гигантскими размерами своих молекул - это макромолекулы, имеющие большой молекулярный вес, исчисляемый тысячами условных единиц.

Макромолекулы характеризуются сравнительно несложной структурой: они представляют собой полимеры, как правило, состоящие из одинаковых или почти одинаковых повторяющихся частей - мономеров. Например, нуклеиновые кислоты состоят из двух или одной полинуклеотидных цепей (соответственно ДНК и РНК), составленных из множества нуклеотидов, каждый из которых включает сахар-фосфат-основание.

Нуклеиновые кислоты являются носителями наследственной информации. При этом они занимают почти весь объем ядра (95%) и небольшую часть объема цитоплазмы (5%).

Белки состоят из длинных полипептидных цепей, включающих мономеры, называемые аминокислотами. Каждая аминокислота имеет аминогруппу и карбоксильную группу. При встраивании аминокислоты в полипептидную цепь она утрачивает эти группы и становится аминокислотным остатком.

Белки - это не только структурные материалы, но и главные «рабочие лошади» организма, выполняющие практически все его функции, отождествляемые с понятием «живой организм». В частности:

- белки формируют видимые и невидимые структуры тела: кожа, ногти и волосы - это кератины; соединительная ткань, хрящи и кости - это коллагены; мышцы - это актин и миозин, осуществляющие сокращение и растяжение мышц;

- белки - сигнальные молекулы, из которых основные - это гормоны, обеспечивающие связи между разными типами клеток и тканей, органов и систем;
- рецепторы - это белки, принимающие сигналы (приемные устройства);
- регуляторы - это ферменты, обеспечивающие все химические реакции и процессы в клетке и организме;
- переносчики ионов и небольших молекул - это белки-транспортеры через клеточные мембраны и т.д.

В свою очередь, липиды (жиры) состоят из длинных углеводородных цепей, обычно включающих 16-18 атомов углерода и другие компоненты.

И наконец, углеводы - это макромолекулы сахаров (полисахариды), состоящие из моносахаров или небольших молекул; они имеют общую формулу: $C_6H_{12}O_6$.

К моносахарам относятся: глюкоза, лактоза, манноза и другие мономеры - они соединяются в длинные цепи и образуют сложные сахара: целлюлозу, крахмал, гликоген.

Клеточные мембраны

Клеточные мембраны имеют ключевое значение в организационной структуре и функционировании разных типов клеток и тканей.

Жидкокристаллическая модель организации мембран

Конструкционной основой наружных и внутренних клеточных мембран служит липидный бислой, образующий текучую жидкокристаллическую матрицу за счет латеральной диффузии липидных и белковых молекул. Другие компоненты занимают не более 5% от общего состава мембран.

По составу и структуре клеточные мембраны - это динамические (модифицирующиеся) системы, скоординированные с внутриклеточными процессами. Они организованы на основе липидов, белков и холестерина. В основе динамики мембранного бислоя лежат липид-липидные и липид-белковые взаимодействия. При этом липиды свободно перемещаются в пределах монослоя мембраны, не взаимодействуя друг с другом, и их поведение зависит от собственной химической структуры.

На рис. 27 приведена жидкокристаллическая модель организации мембраны.

Эта модель объясняет неодинаковое количество молекул белка, приходящееся на единицу площади мембраны, их асимметрию, возможность локализации на наружной или внутренней поверхности, разную толщину мембраны, ее высокое электрическое сопротивление-

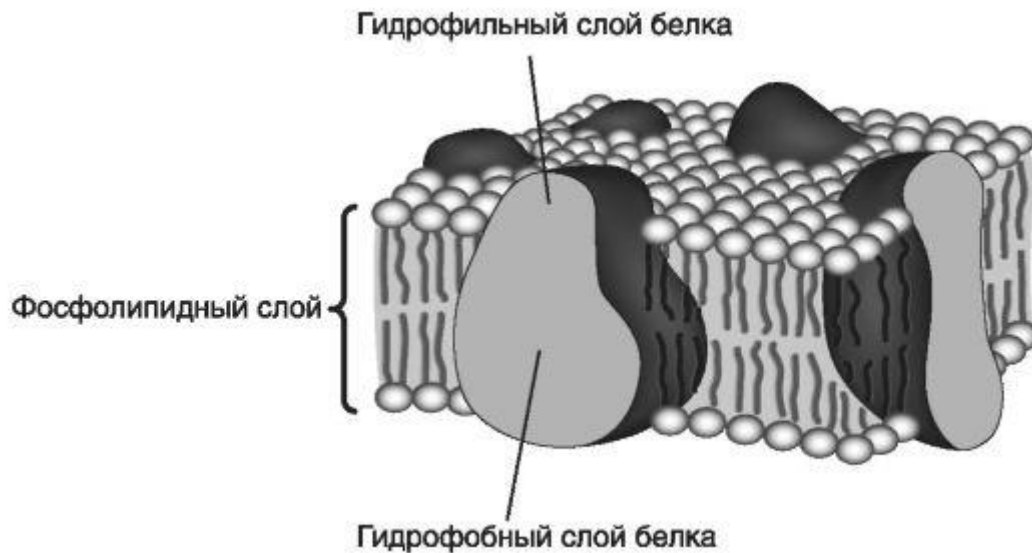


Рис.

27. Жидкокristаллическая модель организации мембраны (по Cell Structure and Function: Lipid Membranes.<http://scidiv.bcc.etc.edu/rkr/Biology101/lectures/pdfs>)

ние, избирательную проницаемость, изменчивость, а также латеральную диффузию с разной скоростью движения липидов и белков в плоскости наружного монослоя. Поэтому данную модель часто называют жидкомозаичной (рис. 28).

Плоскостная (латеральная) структура мембраны сложна, так как содержащиеся в ней липиды и белки не имеют полной свободы перемещения: они «заякорены» за внутренние цитоплазматические структуры клетки (микрофиламенты). Во всех клеточных мембранах выделяют внешнюю (верхняя часть рис. 28, где обозначены волокна внеклеточного матрикса или ЕСМ) и внутреннюю поверхности (под ней расположены волокна цитоскелета).

На внешней поверхности мембраны расположены гликолипиды, и их полярные углеводные части (остатки моно- и олигосахаридов) экспонированы в окружающую среду, т.е. выступают над поверхностью мембраны, образуя наружную оболочку, или гликокаликс. Эти молекулы обеспечивают клеточное узнавание (рецепцию) и иммунохимические реакции. При этом они не могут свободно перемещаться из одного монослоя мембраны в другой.

Центральный (внутренний) монослой мембраны образован фосфолипидами с включениями интегральных белков. Этот монослой обращен жидкокислотными цепями (хвостами фосфолипидов) внутрь бислоя, формируя гидрофобную фазу («боится воды»). Полярные

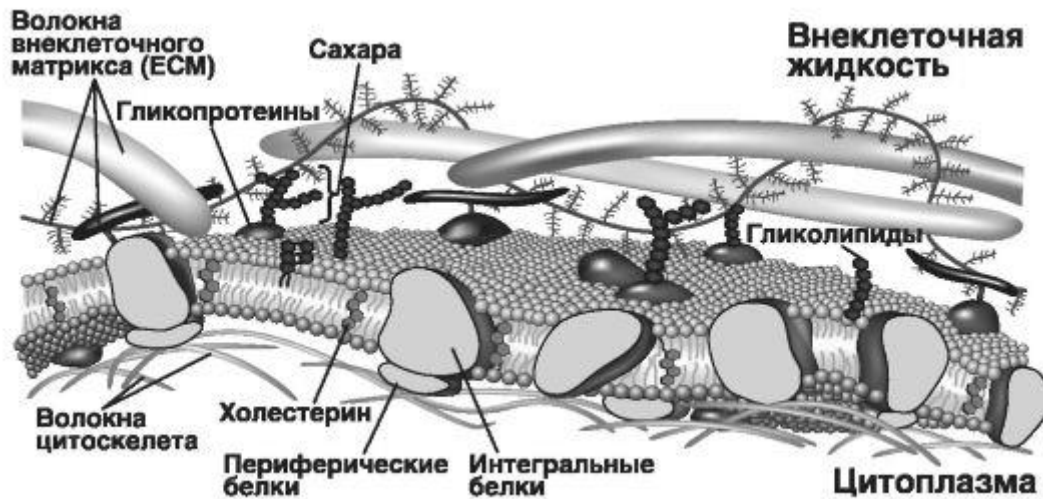


Рис.

28. Схема жидкомозаичной мембраны (по: Cell Structure and Function: Lipid Membranes.<http://scidiv.bcc.etc.edu/rkr/Biology101/lectures/pdfs>)

гидрофильные головки фосфолипидов обращены наружу по обеим сторонам внутреннего неполярного слоя («любит воду»).

Следует отметить, что в ходе эволюции сохранился только общий принцип построения клеточных мембран, в то время как состав составляющих их липидов и жирных кислот существенно изменился у разных видов. Например, в мембранах обнаруживаются сотни липидных единиц, соотношения которых специфичны для разных типов мембран, что объясняется их участием во многих внутриклеточных процессах и свидетельствует об уникальности каждого липида.

В целом клеточные мембраны содержат гетерогенную смесь фосфолипидов, и каждый из них отличается структурой полярной головки, размерами жирнокислотной цепи, степенью ненасыщенности ацильных цепей, характером их связывания и другими особенностями.

Фосфолипиды ведут «двойную жизнь», являясь одновременно «строительными блоками» и модуляторами клеточных процессов. Это либо фосфоглицериды (организованы на основе молекулы глицерина), либо сфингомиелины (производные сфингозина).

Обязательный компонент фосфолипидов - это фосфатная группа, к которой присоединена полярная группа в виде неспецифических азотистых оснований (этаноламин или холин), которые не

кодируют наследственную информацию. Нередко вместо них может встраиваться аминокислотный остаток - серин или углеводный компонент - инозит.

Такие упорядоченные (твердые или гелеобразные) фосфолипиды способны к фазовым переходам, которым свойственна определенная температура плавления (текучести) или $T_{фл}$ - это переход фосфолипидов от фазы упорядоченного в фазу текучего жидкокристаллического состояния.

Температура фазового перехода зависит от:

- длины ацильных цепей и степени их ненасыщенности;
- природы и величины заряда полярных головок;
- химической структуры стерина и соотношения фосфолипиды/холестерин;

- характера взаимодействия между фосфолипидами и белками;
- давления, объема, кислотности;
- концентрации ионов Ca^{2+} .

Насыщенными цепями богаты сфинголипиды, что создает условия для наиболее плотной молекулярной упаковки, и поэтому они имеют сравнительно высокую $T_{\text{ф.п.}}$.

Наоборот, у глицерофосфолипидов, содержащих ненасыщенные ацильные цепи, $T_{\text{ф.п.}}$ более низкая.

Увеличение жидкостности характерно для мембран, образованных на основе ФС, ФГ и ФИ (см. ниже), включающих ненасыщенные жирные кислоты.

В то же время присутствие гликофинголипидов (например, ганглиозидов), имеющих гидрофобную область (похожую на таковую у сфинголипидов), придает бислою мембраны жесткость.

В таблице 6 приведены температуры фазовых переходов для фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭ), содержащих разные жирные кислоты (по Shaw A.W. et al., 2004).

Таблица 6. Температуры фазовых переходов для фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина с разными жирными кислотами

Фосфолипид	Жирные кислоты	$T_{\text{ф.п.}}, ^\circ\text{C}$
ФХ:		
ДСФХ	18:0	55
ДПФХ	16:0	42
ДОФХ	16:0	-7
ДЛФХ	18:0	-16,7
ДМФХ	18:1	-21
ФЭ:		
ДОФЭ	18:0 18:0	58
ДМФЭ	14:0 14:0	48

Примечание. С - стерил; П - пальмитоил; О - олеил; Л - линолеил; ДС, ДП, ДО, ДЛ и ДМ - соответственно дистерил, дипальмитоил, диолеил, дилинолеил и димиристоил; ФХ - фосфатидилхолин, ФЭ - фосфатидилэтаноламин.

Типы клеточных мембран

По электрическому потенциалу выделяют три типа мембран: нейтральные, положительно и отрицательно заряженные мембраны.

Нейтральные (увиттериновые) мембраны находятся в клетках головного мозга и содержат молекулы цереброзидов (ганглиозидов и олигосахаридов), являющихся производными сфингозина (как сфингомиелины). Некоторые ганглиозиды связаны с избыточным накоплением продуктов частичного расщепления гликофинголипидов, что, например, лежит в основе болезни Тея-Сакса (см. главу 21).

По составу ганглиозидов можно определять группы крови в системе АВО, так как их углеводные части отличаются концевыми остатками в олигосахаридных цепях и благодаря этому обладают антигенными свойствами (см. главы 1 и 15).

Следует отметить, что мембраны самих нейронов и миелиновых оболочек нервных волокон богаты гликофинголипидами.

Положительно заряженные мембраны имеют на своей поверхности полярные группы молекул лецитина (см. ниже).

Отрицательно заряженные мембраны имеют на поверхности полярные группы молекул фосфатидилсерина (фосфорилирует белки-мишени и с помощью факторов роста контролирует пролиферацию) и молекулы фосфатидилинозитдифосфата (посредник для двух химических сигналов).

В ходе метаболизма этот посредник преобразуется в диацилглицерин (ДАГ) с образованием Ca^{2+} , который крайне необходим для максимальной активации протеинкиназы C, связанной с молекулой фосфатидилсерина.

Мембранные липиды

Мембранные липиды - это неполярные природные соединения разной структуры. Они включают глицерофосфолипиды (нейтраль-

ные глицериды или фосфолипиды), сфинголипиды и жирные кислоты.

Кроме этих классов, к липидам относятся воска (их молекулы включают до 36 атомов углерода) и некоторые другие вещества. Все они выполняют функции главных компонентов мембран или биоэффекторов, регулирующих внутренние реакции клетки и межклеточные взаимодействия, а также служат формой запаса биологического топлива.

Фосфолипиды клеточных мембран выступают в роли матрикса (ECM), в который встроены белки и ферментные системы клетки.

Общий компонент химической структуры мембранных фосфолипидов - полярная головка и два гидрофобных хвоста (рис. 29).

Главное свойство молекулы фосфолипидов - это амфифильность или сродство к полярной (водной) и гидрофобной (жировой) средам. Оно обеспечивается гидроводородными радикалами жирных кислот

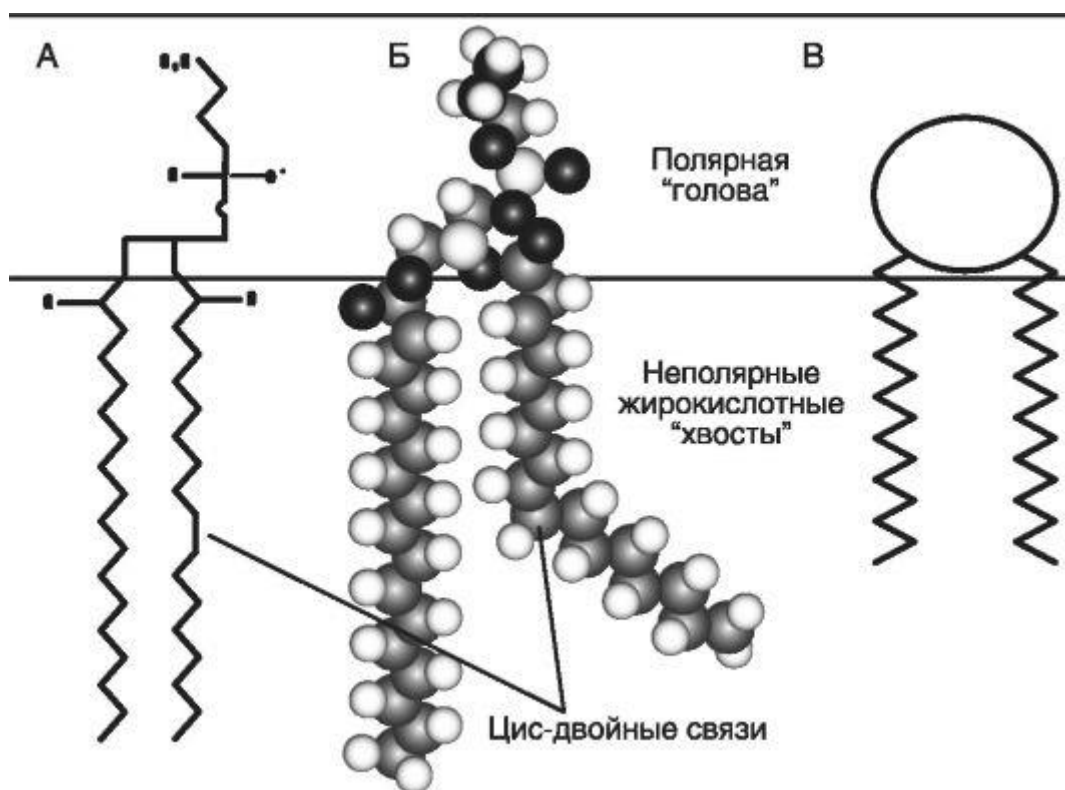


Рис.

29. Химическая структура молекулы фосфолипида клеточной мембраны (по Ипатовой О.М., 2005):

А - общая схема; Б - молекулярная схема; В - упрощенная схема полярной головки и неполярных жирнокислотных хвостов ФЛ

(головка) и остатком фосфата (хвост), соединенными сложноэфирной связью с аминоспиртом.

При этом сама клетка и ее органеллы служат примером липосомы, а находящиеся в крови липопротеины отвечают за транспорт биохимических соединений и по своему строению служат мицеллами.

Липосомы (липидные везикулы) образуются при механическом диспергировании взвеси фосфолипидов в воде. Формы организации липидов в воде определяются зарядом их полярных головок и соотношением объемов, занимаемых головками и неполярными жирнокислотными цепями. Когда эти объемы выравниваются, образуется липидный бислой, и его молекулы имеют цилиндрическую форму.

Если преобладает объем полярных головок, то образуется форма обращенного конуса или мицеллярная форма молекулы фосфолипидов в водном окружении, например лизоФХ.

Глицерофосфолипиды

Глицерофосфолипиды называются липиды, в структуре которых сопряжение между жирной кислотой и полярной группой осуществляется через сложный спирт - глицерин.

К глицерофосфолипидам относятся смеси липидов, молекулы которых содержат одну и ту же полярную часть - фосфохолин и разные жирнокислотные остатки, т.е. одна и та же полярная головка может соединяться с разными цепями, что позволяет создавать многочисленные комбинации молекул. Рассмотрим наиболее важные из них.

Фосфатидилхолин (ФХ) или лецитин, - это основной универсальный фосфолипид, занимающий 35-50% общего объема в мембранах клеток и тканей и 70-75% объема фосфолипидов липопротеинов плазмы крови. ФХ доминирует во многих тканях, например, его содержание в легких - 46,5%, печени - 43,6%, селезенке - 41,2%.

У него многочисленные функции:

- «строительный блок» для мембран;
- интегральный компонент липопротеинов высокой плотности;
- метаболический предшественник для фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина;
- источник ряда липидных мессенджеров и биологически активных соединений, включая лизофосфатидилхолин, лизофосфолипиды, факторы активации тромбоцитов и арахидоновой кислоты, диглицериды; чем больше ФХ, тем хуже он превращается в диглицериды;
- источник холина в клетках мозга;
- в форме дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) или ФХ с высоким содержанием насыщенных жирных кислот входит в состав легочного сурфактанта, обеспечивающего стабильность альвеол и снижающего их поверхностное натяжение, что препятствует слипанию альвеол в момент выдоха;
- участник построения липопротеиновых частиц в эпителиальных клетках кишечника (обволакивает жировые капли, обеспечивая образование поступающих в кровь хиломикронов);
- участник образования желчи в печени, обеспечивающий экскрецию холестерина и его метаболитов (составляет 95% фосфолипидов желчи);
- участник функционирования в клетках печени цитохрома P₄₅₀. Синтез ФХ в клетках и организме строго контролируется.

Последствия нарушений синтеза ФХ опасны для жизни клетки. Например, в результате ингибирования цитозиндифосфохолин (ЦДФ)- зависимого пути или сверхэкспрессии метилирования ФЭ в ФХ может нарушиться липидный гомеостаз, что приведет к избытку или дефициту мембранной поверхности, внутриклеточному накоплению липидов, задержке роста и гибели клетки.

Особенно опасны такие нарушения для быстро обновляющихся клеток крови и печени, в которых ФХ играет роль связывающего звена между апопротеином и нейтральными липидами.

Фактор активации тромбоцитов (РАФ) является биологически активным аналогом ФХ. Содержит простую эфирную связь (вместо сложной эфирной связи у ФХ). Этот фактор инициирует клеточный ответ в гладкой мускулатуре печени, легочной ткани, сердечной мышце и других тканях и органах. Его синтез и высвобождение из клетки ведут к агрегации и освобождению серотонина из тромбоцитов. В низких концентрациях он вызывает агрегацию тромбоцитов, оказывая гипотензивный эффект. Кроме того, РАФ является медиатором острого воспаления (благодаря опосредованному присоединению к специфическим рецепторам), гиперчувствительности и анафилактического шока (синтезируется в ответ на образование комплекса антиген - IgE на поверхности базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, макрофагов и моноцитов).

В клетках РАФ обычно не накапливается (только при воспалении!).

Фосфатидилэтаноламин (ФЭ) или кефалин, участвует в регуляции систем свертывания крови, клеточной адгезии, эндоцитозе и фол-

динге белков (контролирует степень погружения белка в мембрану, обеспечивая необходимую его конформацию), влияет на форму мембраны (благодаря плоскостной структуре вступает в определенное соотношение с ФХ).

ФЭ служит «строительным блоком» для мембраны, являясь одним из электронейтральных (увиттериновых) липидов, в состав которых также входят ФХ и сфингомиелины (СМ).

Анионные фосфолипиды

В последние годы выделены анионные фосфолипиды. Их свойства зависят от пространственного сопряжения положительно заряженных участков белковых доменов и отрицательно заряженных головок липидов, которые окружают эти домены. К наиболее известным анионным фосфолипидам относятся фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, фосфатидная кислота (ФК), фосфатидилглицерин и кардиолипин (КЛ).

Анионные фосфолипиды образуют на поверхности мембраны отрицательно заряженную область, формирующую электростатические связи (полярные и неполярные) с катионными областями пептида, расположенного вблизи мембраны (наибольшую активность проявляют ФК и КЛ; см. ниже).

Среди анионных фосфолипидов различают поверхностномембранные (прилегают к белкам с обеих сторон водной фазы) и внутримембранные (влияют на топологию, ориентацию и образование ансамблей интегральных белков).

Показана уникальная способность анионных фосфолипидов стимулировать «транслокацию» водорастворимых белков, создающую условия для их активации.

Транслокация водорастворимых белков - это их непосредственное присоединение к мембране, что связано с конформационными изменениями белковой молекулы, инициирующими ее переход в активное состояние.

К наиболее изученным внутриклеточным ферментам, регулирующим транслокацию белков к фосфолипидной поверхности, относятся: цитозольная фосфолипаза (cPLA_2), секреторная фосфолипаза (sPLA_2), ЦДФ-холин-зависимая трансфераза и протеинкиназа С.

Фосфатидилсерин (ФС) - единственный фосфолипид с остатком аминокислоты. Его содержание в мембранах в среднем менее 10%, но наибольший его уровень отмечается в мозговой ткани, достигая в мембране ЭР нейрона 20% от общего состава липидов.

По химическому составу молекула ФС имеет три ионизированные группы (аминогруппа, карбоксильная и фосфатная группы). Это кислый липид, поэтому в природе он существует только в солевой форме.

Из его внутриклеточных эффектов наиболее изучено взаимодействие с протеинкиназой С (головки ФС связываются с C_2 -доменами этого фермента). Другие эффекты ФС обусловлены локализацией на несвойственной для него внешней стороне мембраны, которая электронейтральна, но может приобрести отрицательный заряд (например, при активации тромбоцитов или в ходе апоптоза), что приведет к модификации поверхности клетки и ее «узнаванию» белками системы свертывания крови и макрофагами (с последующим удалением).

Интересен также механизм связывания ФС с аннексином V или Ca^{2+} -независимым фосфолипид-связывающим белком. Этот антикоагулянт имеет высокое сродство к ФС, который транслоцируется к поверхности мембраны с образованием кальциевых «мостиков», что вызывает воспалительный ответ (путем ингибирования фосфолипазы PLA_2).

При воспалении аннексин V образует кластеры на поверхности монослоя, предотвращая доступ фосфолипаз к фосфолипидам. При активации клеток аннексин V транспортируется к ядерным мембранам, где возможно образование высокоспецифичного к нему фосфолипидного домена, характерного для апоптических клеток.

Предполагается также связь между процессами перекисного окисления, окислением ФС (не предотвращается витамином E как антиоксидантом) и транслокацией аннексина V.

Помимо указанных механизмов также возможны тяжелые иммунные нарушения, называемые *антифосфолипидным синдромом*, при которых клетки экспрессируют на своей поверхности ФС, связывающийся с бета-2-гликопротеином, что ведет к их удалению макрофагами с помощью специфических рецепторов.

Фосфатидилинозит (ФИ) - важнейший фосфолипид для всех организмов; является ключевым компонентом мембран и одновременно участником различных метаболических процессов.

ФИ - это кислый полианионный фосфолипид, содержащий фосфатидную кислоту, связанную через фосфатную группу с шестиатомным спиртом - инозитом.

В мембранах ФИ локализован на цитозольной стороне бислоя и присутствует во всех тканях, но больше всего в мозговой ткани (до 10%).

В составе ФИ много стеариновой и арахидоновой кислот. Поэтому он служит основным источником арахидоновой кислоты, необходимой для синтеза эйкозаноидов, включая простагландины. ФИ имеет изомеры: ФИ-4-фосфат (PIP), ФИ-4,5-дифосфат (PIP₂), ФИ-3,4,5-трифосфат, которые минимально присутствуют в клетках и тканях, составляя только 5% от общего количества фосфолипидов. Установлено, что содержание PIP и PIP₂ постоянно поддерживается на внутренней стороне мембраны с помощью серий непрерывных реакций фосфорилирования-дефосфорилирования, катализируемых киназами и фосфатазами (см. главу 8).

Наиболее активная роль ФИ и его изомеров связана с процессами трансдукции сигналов, в ходе которых внутренние структуры клетки «узнают» о внеклеточных событиях, например о присоединении антигенов, белков, гормонов и других соединений, выступающих в роли внеклеточных сигнальных молекул (передача апоптозных сигналов, сигналов перегруппировки актинового цитоскелета и инициации внутреннего везикулярного транспорта).

Одновременно ФИ участвует в поддержании структуры GPI- заякоренных белков, в межфазном связывании белков и регуляции их поведения на границах раздела фаз в клетке (электростатическое взаимодействие с ними), особенно РН-доменов.

Как известно, РН-домены обладают сходной третичной структурой, могут служить медиаторами в белок-липидных и белок-белковых взаимодействиях.

Лигандами для них являются фосфорилированные киназами ФИ. В процессе их фосфорилирования до PIP₂ (с участием АТР и киназ) и клеточной активации (в ответ на

внешний сигнал) начинает действовать фосфолипаза C, с помощью которой образуются диглицерид и инозит-трифосфат-3,4,5.

Каждое из этих соединений служит вторичным мессенджером, включающим каскад реакций, в ходе которых диглицерид активирует протеинкиназа C, а инозит-трифосфат-3,4,5 индуцирует выход внутриклеточного Ca^{2+} . Нарушения регуляции этих процессов ведут к разнообразной клеточной патологии.

Фосфатидная кислота (ФК) присутствует во всех живых организмах, являясь важным промежуточным соединением в биосинтезе триглицеридов и большинства фосфолипидов.

ФК - это дианион или отрицательно заряженная молекула, требующая присутствия противоионов. Является биосинтетическим

интермедиатором, который синтезируется *in situ* из других фосфолипидов при действии фосфолипазы D.

Добавление молекулы ФК к фосфатидилхолиновым везикулам повышает чувствительность к агрегации и слиянию, вызываемому

Ca^{2+} .

Показано, что ФК стимулирует гидролиз ФХ-везикул sPLA_2 и может генерироваться во внешнем слое мембраны при воспалении.

Высокая активность такой реакции показана при септическом шоке, при котором уровень секреторной фосфолипазы возрастает в 100 раз, достигая величин, достаточных для гидролиза мембран. ФК присутствует в артритной синовиальной жидкости, а также микровезикулах, образующихся при отпочковывании мембран и отделении участков ее наружного слоя (процесс «шединга»). На это указывает образование лизоФК (предшественник ФК) при действии sPLA_2 .

Полагают, что ФК также связана с процессами, происходящими в аппарате Гольджи, участвует в передаче внутриклеточных сигналов, способствует слиянию мембран, усиливая их кривизну (эффект, противоположный действию лизоФК).

Фосфатидилглицерин (ФГ) образуется при соединении двух молекул фосфатидной кислоты через гидроксил фосфатной группы. Это отрицательно заряженная молекула при физиологическом значении pH среды. ФГ локализуется в легочном сурфактанте вместе с ДПФХ (см. выше), где, по-видимому, участвует в связывании альвеолярных белков. Кроме того, показана роль ФГ как физиологического активатора протеинкиназы C.

Кардиолипид (КЛ). Если к двум молекулам фосфатидной кислоты присоединить еще один фосфоглицериновый фрагмент (через гидроксил второй фосфатной группы), то образуется дифосфатидилглицерин или кардиолипид. Его молекула несет два отрицательных заряда. Она расположена преимущественно на внутренней стороне митохондриальной мембраны и, по-видимому, участвует в доставке белков внутрь митохондрий.

Сфингофосфолипиды

Сфингофосфолипиды (сфинголипиды) или сфингомиелины (СМ). Молекула СМ имеет две цепи, из них одна включает 15 углеродных атомов, другая - остатки жирных кислот. Сопряжение между цепями осуществляется через аминокислотосодержащий спирт - сфингозин. СМ - это многофункциональный аналог ФХ или фосфохолино-

вое производное церамида (церамидфосфадилхолин). Его молекула содержит длинное сфингоидное основание и жирные кислоты.

Концентрация СМ в животных клетках достигает 50% от общего количества фосфолипидов (меньше, чем содержание ФХ). Они локализованы на внешней стороне мембраны, что делает их «строительными блоками» и придает мембране жесткость.

К СМ относятся ганглиозиды, глобозиды, сульфатиды и цереброзиды. В частности, СМ являются структурными компонентами липидов головного мозга (около 10%) и липопротеинов плазмы крови, тесно связаны с холестерином (проявляют к нему сродство), что подтверждается их совместным преобладанием в плазматической мембране и мембране аппарата Гольджи. Вместе с холестерином они составляют основу специфических мембранных доменов, называемых «рафтами» или «кавеолами», которые играют важную роль в передаче внутриклеточных сигналов (см. главу 8).

Показано участие сфинголипидов и их метаболитов в адгезии, ангиогенезе, апоптозе, вазорелаксации (путем регуляции тонуса сосудов через активацию эндотелиальной NO-синтазы), миграции, пролиферации, росте клеток. Некоторые из них (церамид, сфингозин, сфингозин-1-фосфат или SIP) являются медиаторами цитокинов, факторов роста, стрессорных факторов внешней среды. Например, стрессовые факторы среды приводят к генерации транслокации СМ в рафтах, асимметрии в плазматической мембране. В результате ФС остается на несвойственной ему внешней стороне мембраны, а СМ вытесняются из нее на внутреннюю цитоплазматическую сторону, где, по-видимому, гидролизуются СМазой с образованием церамида.

При такой дислокации нарушаются физико-химические свойства мембраны, изменяется жидкость ее микродоменов, происходит перераспределение холестерина по направлению к внутренней части клетки или внеклеточному акцептору (липопротеину), и все это ведет к активации апоптоза.

Показано, что сфинголипиды и их производные участвуют в развитии таких патологических состояний, как атеросклероз и его осложнения, проявления кардиотоксичности, вызванные антрациклинами. Они также усиливают воздействие на клетку внеклеточных эффекторов (цитокинов, факторов роста и липопротеинов), обуславливающих сосудистые нарушения.

Сфинголипиды поступают в организм с пищей, гидролизуются в кишечнике до церамидов и длинноцепочечных оснований, которые затем всасываются и метаболизируются.

За рубежом полагают, что СМ должны входить в состав биологически активных пищевых добавок для профилактики атеросклероза и рака толстой кишки, так как они снижают уровень холестерина в ЛНП и повышают его в ЛВП. Например, в США суточная потребность СМ в расчете на душу населения составляет 0,3-0,4 г.

Плазмалоген - это наиболее сложное по строению производное сфингозина: алкильная или алкенильная форма винилового эфира. В виде холинплазмалогена входит в состав миелина нервной ткани и саркоплазматического ретикулума ткани сердца.

Лизофосфолипиды

Лизофосфолипиды (лизоФЛ) занимают важное место в метаболизме и регуляции функций фосфолипидов. Они состоят из большой гидрофильной полярной головки, прикрепленной к глицериновому или сфингозиновому скелету, а также из одной длинной гидрофобной углеводородной цепи, включающей остаток жирных кислот для лизоглицероФЛ или сфингоидное основание для лизоФЛ. Биологические функции лизоФЛ связаны с ростом

клетки, включая пролиферацию, дифференцировку, выживание и апоптоз. Как правило, их концентрация в мембранах низкая (0,5-6,0%). Именно в такой концентрации они обнаруживаются в крови в связанном с альбумином виде и действуют как вторичные мессенджеры, преобразующие сигналы, полученные от мембранных рецепторов.

В мембранах лизоФЛ генерируются в ходе ферментативного расщепления глицерофосфолипидов и сфинголипидов. Их концентрация повышается при активации тромбоцитов, повреждении тканей, воспалении и неоплазии, ишемии и аритмии миокарда, ишемии и демиелинизации периферических нервов.

Лизофосфолипиды, входящие в состав ЛНП или поврежденных клеток, играют важную роль на ранних стадиях развития атеросклероза и воспалительного процесса, проявляют противоопухолевые свойства и бактерицидную активность. К лизофосфолипидам относят лизосфинголипиды и лизоглицерофосфолипиды.

Лизосфинголипиды

Лизосфинголипиды образуются при гидролизе СМ с последующим обратимым расщеплением церамида до сфингозина и фосфорилю-

ванием сфингозина до SIP, который обладает высокой активностью, являясь регулятором ангиогенеза (см. главу 17). SIP увеличивает пролиферацию и хемотаксис эндотелиальных клеток, стабилизирует атеросклеротические бляшки, стимулирует образование капилляров, усиливает действие фактора роста фибробластов на ткани рогового слоя; SIP также вовлечен в церебральный вазоспазм.

Уровень SIP регулируется ферментами: сфингозинкиназой, SIP- фосфатазой, SIP-лиазой. Вместе с тем, он может покидать мембрану.

В последние годы открыт продукт деацилирования СМ или сфингозин-фосфорилхолин (SPC). Этот лизосфинголипидный регулятор, по-видимому, активирует NO-синтазу и связанный с ней метаболический путь.

SIP и SPC входят в состав ЛНП, особенно в их окисленных формах. Считается, что они относятся к ключевым сигнальным молекулам, вовлеченным в стимуляцию клеточного роста. Эти молекулы совместно со сфингозином являются потенциальными переносчиками Ca^{2+} или кальций-мобилизирующими агонистами. Причем SIP усиливает инициируемое сфингозином освобождение Ca^{2+} , а SPC его мобилизует в гладкомышечных и эндотелиальных клетках.

Лизоглицерофосфолипиды

Лизофосфатидилхолин (лизоФХ). Его немного, но он контролирует молекулярный состав всех мембранных фосфолипидов.

ЛизоФК является высокоактивным лизоглицерофосфолипидом. Его молекула содержит одну длинную углеводородную цепь и фосфатно-гидроксильную полярную головку.

ЛизоФХ входит в состав фосфолипидов ЛНП плазмы крови (особенно в окисленной модифицированной форме), а также в состав безлипопротеиновой фракции крови в комплексе с альбумином - это 6-9% всех фосфолипидов сыворотки. Молекулы лизоФХ образуются путем циклического деацилирования-реацилирования при гидролизе ФХ цитозольной фосфолипазой (cPLA₂).

При этом освобождается ненасыщенная арахидоновая кислота, являющаяся основным субстратом для синтеза простагландинов и лейкотриенов. Включение лизоФХ в состав

мембраны саркоплазматического ретикулума приводит к снижению активности Ca^{2+} -АТФазы, не вызывая изменения подвижности жирнокислотных цепей.

Установлено также, что при экспрессии генов лизоФХ стимулируется рост макрофагов (обусловлен опосредованной протеинкиназой С активацией Т-лимфоцитов и дифференциацией в макрофаги кле-

ток HL-60). Кроме того, лизоФХ служат уникальными стимуляторами процесса сигналинга (медиаторами активности Edg-рецепторов), сопряженного с регуляторными белками (универсальные G-белки) через GPCR-рецепторы, активирование которых инициирует процессы внутриклеточной сигнализации (см. главу 8).

Обнаружение увеличенного содержания лизоФХ в составе окисленных ЛНП считается диагностическим признаком атеросклероза.

Лизофосфатидная кислота (лизоФК) относится к мультифункциональным фосфолипидам с активностью, подобной активности факторов роста. ЛизоФК быстро продуцируется и освобождается из активированных тромбоцитов, оказывая влияние на многие клетки мишени.

Под действием лизоФК-ацилтрансферазы (либо при быстром расщеплении с помощью лизофосфолипаз) лизоФК может превращаться в фосфатидную кислоту, которая индуцирует пролиферацию и дифференцировку, вызывает агрегацию тромбоцитов, сокращение гладкой мускулатуры, сокращение аксонов, ассоциацию адгезивных молекул, участвует в ангиогенезе (совместно с простагландинами и ганглиозидами) и опухолевом росте. Например, лизоФК индуцирует пролиферацию и митогенный сигналинг клеток при раке простаты.

Существенный подъем ее уровня также обнаружен в сыворотке крови женщин с карциномой яичников (уже на первой стадии болезни). Необходимо отметить, что лизоФК совместно с SIP и SPC рассматривается как важнейшая внеклеточная сигнальная молекула, имеющая широкий спектр действия, включая дифференцировку, миграцию клеток, апоптоз, а также регуляцию процессов агрегации тромбоцитов, сосудосуживающей активности, заживления ран, иммуностимуляции и ангиогенеза, мобилизации кальция, ингибирования аденилатциклазы и активации митогенактивирующей протеинкиназы (МАРК).

Следует отметить, что лизофосфолипиды в целом способствуют повышению уровней инозит-3,4,5-трифосфата, дилицеридов, арахидоновой и фосфатидной кислот и благодаря большому полярным головкам обладают способностью инициировать работу мембранных K^{+} -каналов (TREK-каналов), которые регулируются в ходе фосфорилирования, открываются под действием различных стимулов, включая действие самих лизоФЛ, жирных кислот и некоторых анестетиков.

Высокий уровень функционирования TREK-каналов наблюдается в нервной ткани.

Совместное действие лизофосфолипидов и сфинголипидов

Совместное действие лизоФЛ и сфинголипидов на клеточные процессы в организме строго координируется. При этом между собой тесно связаны биохимические реакции их биосинтеза, расщепления и сигналинга. Известны три механизма усиления синтеза ФК с участием сфингозина, SIP и лизоФК.

Первый механизм связан с участием СМазы, создающей в мембране условия для расщепления фосфолипидов фосфолипазой D.

Второй механизм - это стимуляция активности фосфолипазы D с помощью лизоФК.

Наиболее сложный *третий механизм* - это регуляция взаимопревращений ФК в диглицериды и наоборот, с помощью сфингозина и SIP, включая стимуляцию синтеза ФК и ингибирование путей ее расщепления (образование лизоФК с последующим расщеплением до моноглицеридов).

В ходе третьего механизма взаимодействие лизоФК и SIP может быть кооперированным либо антагонистическим. Например, сфингозин и SIP ингибируют образование моно- и диглицеридов, катализируемое фосфолипазой, что обуславливает подавление стимуляции протеинкиназы C, тогда как лизоФК, напротив, стимулирует этот процесс.

Наблюдаемые многочисленные эффекты сочетанного действия лизоФК и сфинголипидов предполагают широкие возможности использования их агонистов и антагонистов для контроля за внутриклеточными процессами, включая механизмы ангиогенеза, онкогенеза, старения и трансплантации.

Значение асимметрии структуры липидов и их распределения в мембранах

Асимметрия структуры липидов и их различное распределение между монослоями мембран позволяют им дифференцированно действовать на внутриклеточные органеллы.

Доказано, что холинсодержащие липиды, ФХ и СМ расположены на внешней поверхности в просвете створок органелл, а аминокислотсодержащие фосфолипиды (ФЭ и ФС) присутствуют и там, и там. При этом белки-ферменты локализованы только на внутренней цитозольной стороне эндоплазматического ретикула (ЭР) и обычно дают неравный асимметричный прирост в одном монослое.

Для перераспределения липидов и доставки к местам будущей локализации внутри мембран ЭР и аппарата Гольджи существуют липидные транспортеры. Известны два механизма перераспределения липидов.

Первый механизм основан на различиях конформационных размеров полярных головных групп: у холина три метильные группы, и поэтому им надо больше места, чем, например, этаноламину, у которого одна маленькая головка.

Второй механизм - это транслокация липидов. Она связана с участием АТФ-зависимых белков-транспортеров липидов. Это основной вид транспорта, вызывающий рандомизацию и асимметрию липидов.

Определены два вида транспортеров липидов, включая АТФзависимую аминокислотфосфолипидтранслоказу или флипазу, транспортирующую фосфолипиды от внешнего к внутреннему монослою. Другая молекула флипазы делает это в противоположном направлении. Выделены также АТФ-независимые транспортеры или скрамблазы, включая Ca^{2+} -активируемую и связанную с ЭР (специфична к глицерофосфолипидам и липидам, содержащим углеводный фрагмент). В целом асимметрия структуры липидов поддерживается двумя противоположно направленными потоками: внутрь идут аминокислотфосфолипиды, наружу - холин и сфингомиелин; неселективные скрамблазы их уравнивают, а АТФ-зависимые транспортеры поддерживают асимметрию.

Именно таким образом скрамблазами нивелируются градиенты концентрации в ответ на стимуляцию клетки.

Небольшой вклад в асимметрию структуры липидов вносит трансмембранная диффузия, протекающая с низкой скоростью из-за высокой собственной энергии (диффузия латеральных доменов фосфолипидов).

Фосфолипидный состав клеток и тканей и липопротеинов плазмы крови

Указанные выше классы основных фосфолипидов занимают в разных клетках и тканях человека от 40 до 90% состава всех фосфолипидов. Причем содержание этих классов и отдельных фосфолипидов меняется в различных ситуациях, на разных стадиях жизненного цикла клетки и онтогенеза в целом.

Например, в эндотелии человека присутствуют фосфолипиды с простыми эфирными связями. Фосфолипиды нервной ткани содержат больше СМ и ФИ-4-фосфата. В шванновских клетках больше

10% ФИ, 3% ФС и 14% ФЭ.

Мало фосфолипидов минорного типа (алкил-ацилФХ и этаноламин-плазмалоген) в коже глазного века и эпидермисе (на фоне повышенного уровня ФХ).

Имеются данные о росте СМ в мембранах клеток при старении и об изменении их содержания в скелетных мышцах.

Особый интерес представляет содержание фосфолипидов в липопротеинах плазмы крови.

Выделяют три основных класса липопротеинов: высокой плотности (ЛВП), низкой плотности (ЛНП) и очень низкой плотности (ЛОНП). Они различаются по размерам и содержанию, наличию определенных белков (апопротеинов) и метаболическому поведению.

Отдельные классы фосфолипидов на поверхности липопротеинов плазмы крови расположены в виде сегрегированных доменов.

Вместе с тем, эти классы липопротеинов имеют общее строение: они формируют глобулы или мицеллы, включающие нейтральные липиды - триглицериды и эфиры холестерина, покрытые монослоем фосфолипидов с белковыми включениями.

На рис. 30 приведено строение глобул липопротеинов плазмы крови. В основе функционирования фосфолипидов в липопротеинах плазмы крови лежит общее с клеточными мембранами свойство - амфифильность (см. выше). При этом фосфолипиды играют роль пограничного слоя между водной средой плазмы крови и гидрофобной глобулой нейтральных липидов, что обуславливает организацию поверхностного монослоя полярных головок в виде ориентированной к наружной водной фазе и устремленных к центру жирнокислотных цепей фосфолипидов.

Иными словами, подобная молекулярная организация фосфолипидов липопротеинов плазмы крови сходна с молекулярной организацией наружного слоя плазматических мембран клеток. В пользу этого свидетельствуют многочисленные данные, например мозаичное расположение белковых молекул и связанная с гидрофобностью и наличием альфа-спиральных фрагментов степень их погружения в липиды.

Белок ЛВП - апопротеин AI (апоА!) локализован на поверхности глобулы, где он взаимодействует с полярными головками фосфолипидов и соприкасается с окружающей водной фазой, что обуславливает его относительную подвижность (вплоть до возможности покинуть липопротеиновую частицу в процессе ее трансформации).

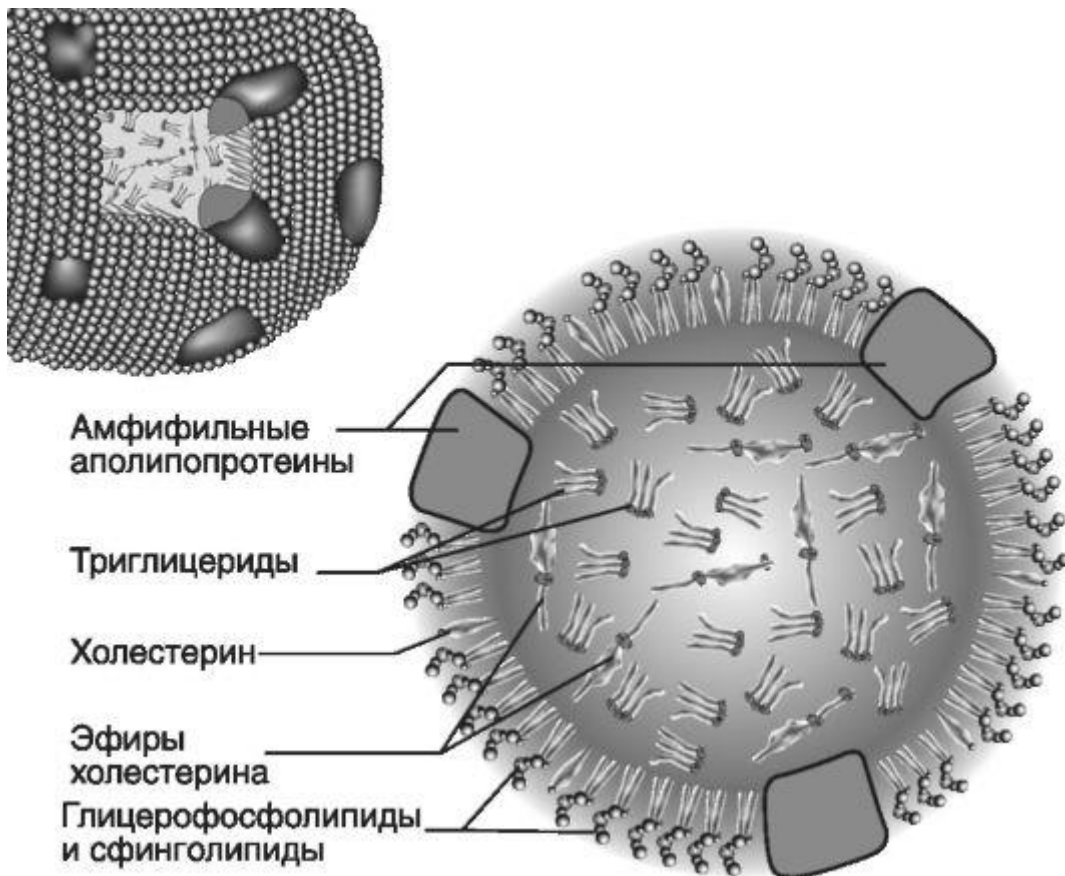


Рис.

30. Строение глобул липопротеинов плазмы крови (по Ипатовой О.М., 2005)

Другой белок ЛВП - апопротеин АII глубже погружен в гидрофобную область липопротеина (из-за наличия жирнокислотных цепей фосфолипидов) и поэтому трудно отделяется от липопротеиновой частицы.

Еще большей гидрофобностью обладает белок - апопротеин В, часть фрагментов которого взаимодействует с остатками жирных кислот фосфолипидов и неполярными гидрофобными липидами (из окружения ядра липопротеиновой частицы, состоящей из эфиров холестерина и триглицеридов). Размеры этого гидрофобного ядра зависят от количества фосфолипидов: объем фосфолипидного монослоя нарастает по мере снижения диаметра ядра.

Другие компоненты поверхности липопротеинов - это также белки. Их содержание колеблется от 2 до 55% в наиболее мелкой (по размеру и плотности) подфракции ЛВП₃.

Еще один схожий компонент липопротеинов расположен в поверхностном монослое между молекулами фосфолипидов (в наружном

слое мембран и липосомах) - это свободный холестерин; здесь его мало (5-15%).

Следует подчеркнуть сходство липопротеинов (ЛОНП и ЛНП) и клеточных мембран по величинам молярного соотношения холестерина/фосфолипиды, которое соответствует 0,7-0,8, тогда как для подфракций ЛВП оно вдвое ниже.

Таким образом, состав фосфолипидов липопротеинов плазмы крови подобен составу таковых наружного слоя мембран, для которого характерна преимущественная локализация холинсодержащих фосфолипидов, ФХ и СМ.

Вместе с тем, у липопротеинов нет внутреннего мембранного слоя и почти отсутствуют аминокислотосодержащие фосфолипиды, что, возможно, связано с конусообразной формой их молекул.

В липопротеинах более 90% от объема всех фосфолипидов приходится на долю ФХ, СМ и лизоФХ. В основном это ФХ, доля которого вдвое выше, чем в клеточных мембранах, что связано с особенностями синтеза липопротеинов и их секреции в печени мембранами гепатоцитов.

Так, в гепатоцитах липопротеиновые частицы формируются под влиянием синтезированных в них апопротеинов, которые секвестрируют участки микросомальной мембраны ЭР со всеми находящимися в них пулами фосфолипидов. При этом эффективным предшественником последних в липопротеинах плазмы крови является не ФЭ, а ФХ.

Возможен также путь внеклеточного формирования пребета-ЛВП, согласно которому апоА1 в свободном состоянии может секретироваться клетками печени, а остальные фосфолипиды забираются им с мембран белка АВС А1.

При образовании ЛОНП (как и хиломикронов в кишечнике) фосфолипиды совместно с апопротеинами покрывают поверхность высокогидрофобных триглицеридов, обеспечивая их секрецию в кровь в виде стабильных фрагментов.

Частицы ЛВП высокодинамичны и постоянно ремодулируются с участием специфических транспортных и ферментных белков плазмы крови и клеточных мембран.

В таблице 7 приведен состав и объем фосфолипидов липопротеинов плазмы крови.

Таблица 7. Состав и объем фосфолипидов липопротеинов плазмы крови (%)

Классы фосфолипидов	ЛОНП	ЛНП	ЛВП
ФХ	76,2 ± 1,6	77,1 ± 2,1	66,0 ± 0,2
СМ	13,1 ± 0,4	16,2 ± 0,1*	29,2 ± 0,6
ФЭ	4,7 ± 0,2	3,6 ± 0,4	4,8 ± 0,2**
ФС	0,13 ± 0,03	0,7 ± 0,1	0,06 ± 0,02***
ФИ	0,41 ± 0,04	0,4 ± 0,1	2,81 ± 0,04
ЛизоФХ	3,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,14 ± 0,08
КЛ + ФГ	0,42 ± 0,04	0,77 ± 0,08	0,4 ± 0,06***

Примечание

* Значение $R_{ЛНП}$ достоверно по отношению к $R_{ЛОНП}$ и $R_{ЛВП}$ (Subbaich P.V., 1997). ** Данные для ФЭ приведены вместе с таковыми для плазмалогенов. *** Данные для ФС приведены по работе Н. Deguchi et al., 2000. - Измерения не проводились.

Между тем, стойкие различия по составу фосфолипидов в липопротеинах плазмы крови определить не всегда возможно по причине постоянно идущих в кровяном русле процессов их преобразования, транспорта (перехода) индивидуальных апопротеинов и липидов с участием фосфолипид-транспортного белка и непрерывного обмена фосфолипидов между липопротеинами и мембранами клеток.

К редким примерам генетических нарушений состава липопротеинов плазмы крови относятся два заболевания.

- Абетапопротеинемия. Ген локализован в коротком плече хромосомы 2 (2p24). Болезнь характеризуется отсутствием транспорта триглицеридов из тонкого кишечника и печени. В результате развивается дефицит ЛНП.
- Семейная форма болезни танжерских островов. Характеризуется дефицитом ЛПВ.

Жирные кислоты клеточных мембран

Жирные кислоты клеточных мембран - это цепи длинных молекул, содержащих от 10-12 до 26-28 атомов углерода. Они соединены с аминспиртом с помощью карбоксильной (СО) и гидроксильной (НО) групп. Всего насчитывается около 800 типов жирных кислот. Однако в составе природных липидов всех тканей их количество не превышает 20, а фактически встречаются только 10-12 типов.

Например, в мембранах человека выделены не менее 10 типов ФХ, включающего разные жирнокислотные остатки: пальмитиновый, арахидоновый, линолевый, стеариновый и др.

Выделяют ненасыщенные, насыщенные и полинасыщенные жирные кислоты (ПНЖК). Они присутствуют в каждой мембране или липопротеине.

Показателем ненасыщенности молекул жирных кислот является наличие в их структуре двух двойных связей и более (таких кислот больше 50%). От этого показателя зависят положение, поведение и свойства фосфолипидов в мембране. В ходе метаболизма в молекулу жирных кислот могут быть введены либо дополнительные двойные связи (с помощью фермента - десатуразы), либо может быть увеличена длина углеводородного скелета на 2 атома углерода (благодаря ферменту - элонгазе).

К основным ненасыщенным жирным кислотам (моноеновым) в фосфолипидах относятся олеиновая и в меньшем объеме - пальмитолеиновая кислоты.

Основные насыщенные жирные кислоты - это пальмитиновая и стеариновая; редко встречаются миристиновая, каприловая и лигноцериновая.

Все клетки способны синтезировать основные насыщенные жирные кислоты *de novo*.

Полинасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) в природе, как правило, встречаются в виде линолевой, альфа-линоленовой и докозагексаеновой кислот. Причем первые две кислоты совместно с арахидоновой кислотой - это эссенциальные жирные кислоты, которые поддерживают жидкость и проницаемость мембран. По мере увеличения массы тела в мембранах клеток сердца, мышц, печени и почек снижается содержание ПНЖК (особенно докозагексаеновой кислоты), что отражает степень метаболической активности этих клеток.

Существует определенная избирательность в предпочтении отдельных жирных кислот отдельными фосфолипидами, например, для ФИ, ФХ и ФС - это пальмитиновая, для СМ - докозагексаеновая, для ФС и КЛ - линоленовая, для ФИ - арахидоновая. Такая избирательность связана с их участием в разных метаболических процессах. Например, сочетание пальмитиновой и олеиновой кислот характерно для ФХ (21% всего состава), тогда как в молекулах ФЭ, ФИ и ФС у тромбоцитов они не встречаются. Сочетание арахидоновой и стеари-

новой кислот преобладает в молекулах ФЭ и ФИ (до 71%).

Арахидоновая кислота служит источником тромбоксана и неравномерно распределена между ФЛ, что говорит о селективности на начальном этапе образования тромбоксана и простагландинов (в первую очередь гидролизуются ФЭ и ФИ).

Мембранные белки

Если образно представить структуру липидного бислоя мембраны как «море липидов», то плавающие в нем белки - это «айсберги». Их называют интегральными белками, они частично погружены в мембрану или пронизывают ее насквозь (см. рис. 28). У такого белка один конец полипептидной цепи гидрофобный («боится» воды), другой - гидрофильный (взаимодействует с водой), т.е. это амфипатичные белки. При этом последовательности гидрофобных остатков аминокислот формируют сами пронизывающие мембрану структуры, а последовательности гидрофильных остатков аминокислот образуют функциональные домены по обе стороны мембраны, создавая не строго фиксированную мозаичную структуру, а своеобразные кластеры (семейства) из участков поверхностного монослоя.

С интегральными белками связаны реакция клетки на внешние и внутренние воздействия, а также регуляция потоков ионов через мембрану извне и внутрь клетки. Причем для транспорта определенных ионов существует свой определенный белок.

Имеются также ассоциированные с мембранами глобулярные белки. Они расположены либо на полярной поверхности мембраны, либо частично погружены в ее внутренний слой с обеих сторон. Такие белки удерживаются на поверхности мембраны с помощью нековалентных связей, и поэтому их нередко называют периферическими белками.

В целом среди белковых компонентов мембраны выделены белки-транспортеры, белки-рецепторы и белки-регуляторы. Например, в последнем случае это регуляторы синтеза, состава и расположения индивидуальных фосфолипидов, регуляторы (с помощью фосфоорилазы А) деацилирования (ремоделирования) и трансбислойного перемещения отдельных молекул фосфолипидов (механизм «флипфлоп», или перемещение между наружным и внутренним монослоями мембран).

Все встроенные в мембрану белки придают ей функциональную гибкость и способность участвовать в различных клеточных эффектах. Кроме встраивающихся, выделены белки, которые в мембрану не

встраиваются, а удерживаются на ее поверхности за счет слабых связей и взаимодействий, благодаря так называемому заякориванию.

Особый класс белков - это адгезионные белки: кадхерин, тканеспецифические белки, обеспечивающие объединение однотипных клеток в ткани, например молекулы NSAMS или соединительные белки нервных клеток.

Другие компоненты клеточных мембран

Наряду с липидами и белками существуют следующие компоненты клеточных мембран.

Гликопротеины. К выступающей над клеточной мембраной части молекулы белка присоединяются короткие или иногда разветвленные цепочки сахаров. На их концах находятся молекулы сиаловой (нейраминовой) кислоты - именно такой комплекс регулирует прохождение потоков ионов через мембрану.

Этот комплекс или гликопротеидный рецептор (см. ниже) обладает сродством к лигандам и поэтому способен их распознавать. К ним относятся: антигены, медиаторы, рецепторы других клеток, бактерии, вирусы и прочие чужеродные вещества.

Гликолипиды. Это производные церамида (близки по форме к ацилглицерину), лишенные фосфорильных групп, но содержащие углеводные компоненты. Поэтому их также называют гликосфинголипидами. Состав мембранных гликолипидов или гликолипидных рецепторов (см. ниже) представлен остатками жирных кислот, образующих их гидрофобный хвост.

Холестерин. Холестерин необходим как для пролиферации (см. главу 9), так и для функционирования клеток.

Конфигурация молекулы холестерина позволяет ему включаться в состав мембран, так как он представляет собой вытянутую молекулу с жестким стероидным ядром и гибкой углеводной цепью. Эта молекула амфипатична. На одном из концов молекулы холестерина находится полярная гидроксильная группа (НО), которая встраивается между молекулами липидов в зоне полярных головок мембранного бислоя.

В жидкокристаллическом состоянии холестерин повышает степень упорядоченной ориентации и снижает скорость движения углеводородных цепей фосфолипидов. Благодаря этому он активно участвует в «текучести» мембраны, препятствуя плотной упаковке углеводородных цепей и снижая температуру плавления липидов. Внешне это выглядит как «расплавление области фазового перехода»

(см. выше). Без холестерина фазовый переход происходит в узком температурном интервале.

Содержание холестерина в клеточных мембранах колеблется. Например, мембрана эритроцита содержит 25% холестерина, но его крайне мало в мембранах митохондрий и вообще нет в бактериальных мембранах.

Изменение биосинтеза холестерина - это самостоятельный путь регуляции физического состояния мембран. Он опосредован высвобождающимся из ЭР транскрипционным фактором (SREBP). Выход этого фактора блокируется холестерином, а при дефиците холестерина «блок» снимается и включается процесс транскрипции оксиметилглутарил-СоА-редуктазы. Важность участия холестерина в обменных процессах в организме можно проследить на примере морфологических, молекулярных (генетических) и популяционногенетических доказательств. Например, хорошо изучен механизм проникновения ЛНП в сосудистую стенку путем пиноцитоза или через межэпителиальные щели с последующей сорбцией холестерина гликозаминогликанами, отложением в виде атеросклеротических пятен, полосок и бляшек и пролиферацией гладкомышечных клеток.

Показано также образование атеросклеротических бляшек в культуре клеток при добавлении в питательную среду бета-липопротеинов. К генетическим доказательствам относятся гомо- и гетерозиготные формы *семейной гиперхолестеринемии* (см. главу 22), при которых наблюдается высокое содержание холестерина в плазме крови.

По признанию специалистов, моногенно наследуемая семейная гиперхолестеринемия - это природная модель «галопирующего атеросклероза».

Наконец, к популяционным доказательствам значения холестерина относится наличие двух народностей (вегетарианцы в Новой Гвинее и мясоеды в Африке), не болеющих атеросклерозом, у которых уровень плазменного холестерина не превышает 5,2 ммоль/л.

Вместе с тем, у американских эмигрантов японского происхождения частота и тяжесть атеросклероза значительно выше, чем у японцев, проживающих на исторической родине, что связывают с диетическими различиями.

Принципиальными являются данные о возможности процесса регрессии атеросклероза при голодании организма, исключении атерогенной диеты и экстракции холестерина из плазмы крови

(гемосорбция). Эти данные были получены группой российских ученых, сформулировавших учение о холестеринозе и выделивших три периода в развитии клетки и организма, связанных с обменом холестерина.

- *Первый период* - это интенсивный рост и пролиферация клеток, сопровождающиеся высокой потребностью в холестерине, который идет в основном на строительство клеточных мембран (физиологическая или «оправданная», гиперхолестеринемия).
- *Второй период* - это самый длительный, наиболее активный период жизни организма (см. главу 11). В этом периоде, как правило, наблюдается устойчивое равновесие между поступлением (синтезом) и расходом холестерина, участвующего в процессах образования жирных кислот и стероидных гормонов, необходимых для поддержания активной физической и психической (трудовой и интеллектуальной) деятельности и репродуктивной функции.
- *Третий период* - это наступление инволюции клеток и организма, когда функции второго периода постепенно утрачиваются и происходит медленное накопление холестерина в плазматических мембранах сначала в отдельных клеточных ассоциациях, затем отдельных органах и целом организме.

Вода (см. также начало главы 7). Роль воды как компонента клеточных мембран заключается в ее способности к удержанию на поверхности мембран, что обеспечивается с помощью водородных связей, возникающих между полярными головками фосфолипидов и молекулами воды, - это стабилизирует бислой, покрывающий снаружи молекулы фосфолипидов и белков.

Функции клеточных мембран

Клеточные мембраны обеспечивают не менее 12 клеточных функций. Среди них следующие.

- Определение границ компартментов цитоплазмы (отграничение их от окружающей внутриклеточной среды), что позволяет им сохранять автономность внутреннего устройства клетки и независимость работы ее многочисленных функциональных систем, изолированно осуществлять и регулировать реакции метаболизма. При этом внутриклеточные ферменты либо катализируют трансмембранные реакции, либо участвуют в реакциях на поверхности наружной мембраны, обеспечивая их избирательность и эффективность.
- Поддержание высоких концентраций (градиентов) необходимых химических соединений и ограничение поступления чужеродных соединений, что обеспечивает необходимый электрический потенциал и позволяет запасать энергию в отдельных органеллах и клетке в целом. Например, мембрана как барьер препятствует утечке из клетки компонентов цитоплазмы и сильно полярных молекул. Вместе с тем через мембрану как проводник легко диффундируют слабо полярные молекулы малого размера.
- Обеспечение активного и пассивного трансмембранного транспорта веществ и соединений с помощью транспортных белков и других молекул. Следует отметить, что только из уже перечисленных функций видно, что мембраны активно участвуют в обеспечении основных клеточных процессов, и в случае разрушения мембран может наступить гибель клеток.

- Определение природы всех внутренних и внешних связей клетки с помощью специфических рецепторных белков.
- Сохранение содержимого клетки и обеспечение межклеточного взаимодействия. Мембраны сохраняют молекулярное содержимое клетки и не позволяют ему свободно проходить через них.
- Объединение однотипных клеток в ткани с помощью мембранных белков - кадхеринов (см. выше), что обеспечивает участие клеток в тканеспецифической дифференцировке.
- Всасывание и последующий перенос компонентов биологического топлива (см. главу 7).
- Преобразование сигналов (рецепторная функция). Как известно, молекулярная жизнь - это непрерывные биохимические преобразования, в ходе которых клетки должны работать согласованно в соответствии с нуждами всего организма, о которых они узнают с помощью сигналов в виде поступающих к ним химических веществ (нейромедиаторы, гормоны, другие факторы). Одни сигналы проникают внутрь клетки, другие - нет. В любом случае, они связываются на поверхности клетки со специализированными белками-рецепторами, которые отвечают за прием и передачу сигналов, благодаря цепи последовательных реакций, происходящих внутри клетки. Именно это имеется в виду, когда говорят о клеточных мембранах как преобразователях сигналов.
- Участие в клеточном делении. Мембраны участвуют в делении благодаря возможности слияния и разделения липидных бислоев, чему способствуют появление и ликвидация перетяжек в ходе митоза.
- Участие в эндоцитозе, или процессе поглощения клеткой частиц или крупных молекул, которые не могут пройти через мембрану, и тогда вокруг них образуется вакуоль или пузырек (отщепившаяся часть плазматической мембраны).
- Участие в экзоцитозе или процессе перемещения вакуоли наружу клетки, выводящем ее содержимое во внеклеточную окружающую среду, например, секреция ферментов поджелудочной железы.
- Обеспечение работы натриево-калиевого насоса или Na^+/K^+ - АТФазы. Этот насос выкачивает натрий и закачивает калий благодаря гидролизу АТФ до $\text{ADP} + \text{P}_i$. Данный фермент имеет две субъединицы (альфа и бета), взаимодействующие с лигандами (см. главу 8). Изменения в натриево-калиевом насосе происходят при фосфорилировании белка, который изменяет свое сродство к ионам натрия и калия. При этом натрий связывается и выходит в межклеточное пространство. Одновременно на внешней поверхности мембраны связывается калий и также происходит фосфорилирование белка, которое возвращает его в первоначальное состояние, и поэтому ионы калия поступают в цитоплазму. Один цикл работы такого насоса сопровождается встречным переносом трех ионов Na^+ (внутри) и двух ионов K^+ (снаружи) + $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$ - три иона Na^+ (снаружи) + два иона K^+ (внутри) + $\text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+$. Следует отметить, что работа насоса угнетается сердечными гликозидами (например, наперстянкой), что увеличивает концентрацию ионов Na^+ в миокардиоцитах и тем самым уменьшает его градиент, что ведет к увеличению содержания в цитоплазме ионов Ca^{2+} и стимулирует сокращение сердечной мышцы.
- Обеспечение механизма унипорта или переноса любых растворимых веществ с одной стороны мембраны на другую. В таком переносе участвуют транспортные белки, например фермент

Ca^{2+} -АТРаза из ЭР.

- Участие в механизме симпорта или совместного переноса молекул через мембрану. Выделен специфический белок, отвечающий за симпорт ионов Na^+ и глюкозы в строго эквимоллярных количествах. В результате глюкоза движется внутрь клетки против своего концентрационного градиента за счет градиента ионов Na^+ . Так как градиент возникает за счет гидролиза АТФ, то сам АТФ косвенно служит движущей силой для транспорта глюкозы. Подобный механизм работает при всасывании аминокислот и глюкозы в кишечнике с использованием для симпорта других
- белков. Следует отметить, что белков для совместного переноса разных молекул через мембраны очень много. Их транспорт может быть пассивным, когда движущей силой служит градиент концентрации. Однако молекулы могут двигаться против собственного градиента (активный транспорт). Участие в механизме антипорта или жестко связанного противотока. Этот механизм характерен, например, для действия сердечных гликозидов, в ходе которого наружу выкачиваются ионы Ca^{2+} , а также молекулы, транспортируемые против собственного концентрационного градиента за счет энергии натриевого градиента, который, в свою очередь, создается благодаря гидролизу

АТФ.

На рис. 31 приведено участие митохондриальной мембраны в механизмах антипорта и симпорта.

Клеточные рецепторы

Для приема сигналов в клетке имеются связанные с мембраной специфические структуры - рецепторы. Рецептор - это участок мембраны с олигосахаридной цепочкой. Если эта цепочка связана с молекулой мембранного белка, то это гликопротеидный рецептор, если с молекулой липида - гликолипидный рецептор.

Гликопротеидный рецептор - это молекула глобулярного или спирального белка, погруженная в оба слоя мембраны, поэтому рецептор может в ней «плавать», перемещаться и соединяться с другими рецепторами, образуя агрегаты, концентрирующиеся на одном из

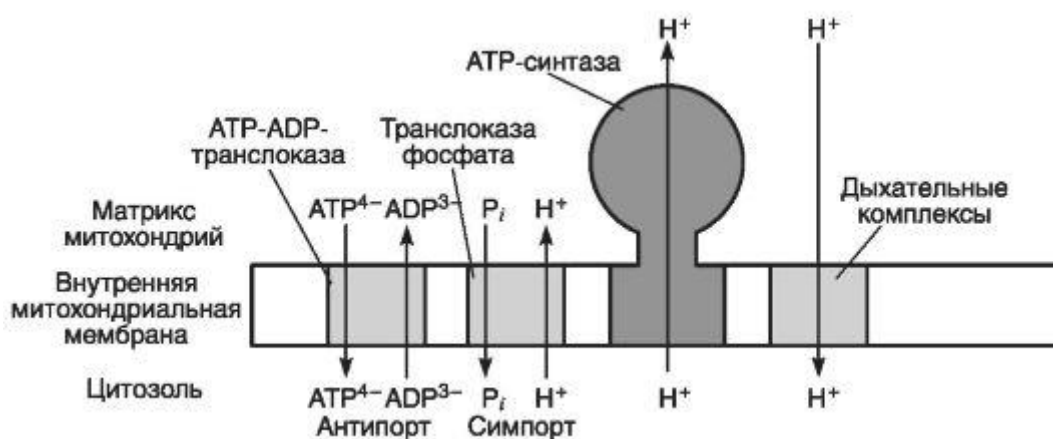


Рис.

31. Участие митохондриальной мембраны в механизмах антипорта и симпорта (по Эллиот В., Эллиот Д., 2002)

полюсов клетки с образованием рецепторного поля - так называемый *киппинг-эффект*.

Гликолипидный рецептор (ганглиозид, сульфатид) связан с одним поверхностным слоем мембраны и замещает в нем одну молекулу фосфолипидов. Он может «сбрасываться» в межмембранное пространство, поступать в кровяное русло, а из него снова встраиваться в мембрану.

Молекулы ганглиозидов находятся в мембране в стационарном состоянии, но постоянно перестраиваются в зависимости от рецепторной функции, переходя из рецепторов одной формы в таковые другой формы. При этом олигосахаридная цепочка видоизменяется по составу, количеству и последовательности соединения сахаров - это *система легких рецепторов*. Их образование резко возрастает при дендритном спрунинге (см. главу 12). Наоборот, гликопротеидные рецепторы - это *система тяжелых (тугоподвижных) рецепторов*.

При внешней сигнализации существует определенная обратная зависимость между числом рецепторов на мембране и готовностью клетки к образованию межклеточных контактов, а также ее способностью к пролиферации: чем больше число рецепторов и межклеточных контактов, тем ниже потенциал пролиферации клеток (см. главу 8 и 25).

Следует отметить, что клетки злокачественных опухолей, обладающие высоким потенциалом пролиферации, «сбрасывают» свои рецепторы (ганглиозиды), уменьшая тем самым способность к контактам с другими клетками.

Вместе с тем, нейрон никогда не перерождается в злокачественную клетку, так как способен к образованию до 10 тыс. синаптических контактов.

В силу способности к растворению в воде большинство сигнальных молекул связываются только с внешними рецепторами. Их меньшая часть (стероидные гормоны, тироксин и оксид азота) растворяются в липидах и поэтому поступают прямо в клетку через липидный бислой мембраны, где связываются с внутренними рецепторами. Такая регуляция получила название *рецептор-опосредованной сигнализации* (см. главы 7, 8 и 11).

Межклеточные соединения

К межклеточным соединениям (промежуткам) относятся плотные белковые конструкции, состоящие из соединительной ткани. Они не пропускают через себя биологическое топливо, в них нет латеральных

движений белков. Зато есть особые щелевые контакты или контактные поры - это белки, способные пропускать молекулы АТР и сигнальные молекулы. В этих контактах также содержатся адгезионные белки, необходимые для объединения однотипных клеток в ткани.

ГЛАВА 7 ОБМЕН ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКЕ И ОРГАНИЗМЕ

Метаболизм как превращение энергии

С молекулярных позиций, жизнь многоклеточного организма - это сложно организованные генетические и биохимические реакции, упорядоченно протекающие на клеточном, межклеточном, тканевом, органном и системном уровнях организации и отражающие обмен веществ или взаимодействие между молекулами и атомами различных химических соединений (биологических материалов).

Реакции, происходящие в ходе обмена веществ, называются метаболизмом или метаболическими реакциями. Как сказано в предыдущей главе, в числе главных

химических соединений клетки значатся: вода (70-90% объема), определяющая свойства биологических материалов; растворенные в воде соли Na, Ca, K, Mg, Cl и другие микроэлементы; органические соединения (10-30% объема), являющиеся ценным видом биологического топлива. Разнообразие органических молекул создается в ходе соединения атомов углерода с атомами других химических элементов.

Каждый химический элемент характеризуется валентностью или способностью образовывать определенное количество ковалентных связей. Именно так образуются простые молекулы: спирты (алкоголь), включающие углеродную цепь и гидроксильную группу (HO), амины (аминогруппа - NH₂), кислоты (карбоксильная группа - COOH) и др. Из разных сочетаний простых молекул образуются сложные молекулы, в том числе наиболее важные для организма молекулы нуклеиновых кислот, белков, жиров и углеводов. Все эти молекулы образуются в результате метаболических реакций. Известны два типа метаболических реакций: анаболические или синтез необходимых для жизни молекул (анаболизм) и катаболические или распад молекул (катаболизм). Участник метаболической реакции - это метаболит, результат метаболической реакции - это продукт. Если продукт метаболической реакции служит исходным веществом для следующей реакции - это субстрат.

Цепь из таких последовательных реакций - это метаболический путь. Метаболические пути сложны и взаимосвязаны. Каждый путь

должен мгновенно подстраиваться к текущей ситуации в отдельной клетке и во всем организме, исходя из информации, поступающей от других путей или разных звеньев одного пути. Любой метаболический путь основан на превращениях энергии, которые определяют, какой путь возможен, а какой нет.

Превращения энергии (ее преобразования) - это с одной стороны согласование производства биологического топлива с постоянно меняющимися потребностями в нем; с другой стороны это подчинение скорости и направлений преобразования энергии в отдельных клетках нуждам и жизненному ритму всего организма, который периодически принимает пищу и голодает, работает и отдыхает, вынашивает, кормит, растит и обучает свое потомство опыту взаимодействия с окружающей средой. Кроме того, в ходе своего функционирования любой организм кратковременно или длительно, редко или часто болеет, затрачивая в период болезни запасы имеющейся энергии.

Таким образом, превращения энергии в клетках, тканях, органах и системах организма происходят постоянно в течение всей жизни индивида. Однако условно можно считать, что они начинаются с приема пищи, когда молекулы пищевых веществ «разбираются» клетками для получения энергии (биологического топлива), которая затем используется для метаболизма и синтеза необходимых организму веществ.

Координация и интеграция всех энергетических превращений обеспечивается главными регуляторными системами организма: нервной и эндокринной, а также иммунной системой, которая проявляет свое регулирующее действие либо опосредованно через нейроэндокринную регуляцию, либо через свои лимфоидные органы, обладающие эндокринной функцией (см. главу 14). В целом контроль за превращениями энергии в организме обеспечивается совместным действием нейромедиаторов, гормонов, регуляторных факторов роста, а также множеством сигнальных молекул-посредников энергетического метаболизма (см. главу 8).

Говоря о роли отдельных клеток и тканей в распределении и потреблении энергии, поступающей в организм в виде продуктов питания, а также о роли воды (см. главу 6), следует выделить наиболее энергоемкие и энергозатратные клетки печени, мышц, мозга,

жировые клетки и эритроциты. Например, клетки печени при нормальном питании запасают глюкозу в виде гликогена, а при голодании освобождают ее до тех пор, пока не исчерпан весь его запас. Если запас

гликогена истощен, печень превращает в глюкозу аминокислоты (глюконеогенез), а жиры (жирные кислоты) сначала превращает в кетонные тела, а потом (через окисление) синтезирует из них триглицериды, являющиеся переносчиками энергии. Триглицериды поступают в кровь и разносятся во все ткани и органы, включая мозг, который не имеет собственных энергетических запасов. Поэтому транспорт глюкозы в нейроны носит пассивный характер, не требующий затрат энергии извне. В системе пассивного транспорта участвуют регуляторные поры, каналы межклеточных соединений и клеточных мембран (см. главу 6). Эти каналы контролируют прохождение различных молекул и потоков ионов, и их пропускная способность (например, для ионов Ca^{2+} , K^{+} и Na^{+}) зависит от внешних для клетки сигналов, поступающих к воротам каналов, в которых расположены распознающие их рецепторы.

В свою очередь, транспорт глюкозы в эритроциты носит активный характер, так как происходит за счет концентрационного градиента или облегченной диффузии благодаря двустороннему встречному движению анионов Cl^{-} и HCO_3^{-} через плазматическую мембрану эритроцита. При этом активный транспорт совершается за счет внешнего источника энергии, выделяемой при гидролизе АТФ, и идет (благодаря такому перемещению) против концентрационного градиента.

Разнообразными источниками энергии для мышц служат глюкоза и гликоген, жирные кислоты, кетонные тела и аминокислоты. Особое место во внутриклеточном энергетическом обмене занимают митохондрии, ответственные за «тканевое дыхание» или энергетический обмен за счет процессов окисления и фосфорилирования, а также синтеза АТФ для «критически зависимых» тканей и органов, функционирование которых полностью зависит от своевременного пополнения запасов АТФ. В числе таких «критически зависимых» морфофункциональных структур находятся клетки и ткани головного мозга, миокарда, скелетных мышц, сетчатки глаз, островки Лангерганса в поджелудочной железе и др. Происходящие в них нарушения энергетического обмена вносят значительный вклад в спектр и объем наследственной патологии человека.

При этом часто «страдают» и сами митохондрии. Так, к настоящему времени идентифицирован большой класс митохондриальных болезней (свыше 200 нозологий), проявляющихся инвалидизацией больных за счет тяжелой нейродегенеративной симптоматики на фоне значительного снижения энергетических запасов (см. главу 26).

В частности, нарушения структуры и функции митохондрий выявлены при болезнях Альцгеймера и Паркинсона (см. главу 28), кардиомиопатическом синдроме, сахарном диабете и другой патологии.

Трофическое обеспечение

Трофическое обеспечение или трофика, - это совокупность метаболических реакций, определяющих сохранение структуры и функционирования клеток, тканей, органов и систем организма, их увеличение в процессе избыточной функциональной нагрузки (состояние гипертрофии) или уменьшение в процессе функциональной бездеятельности (состояние гипотрофии). Трофическое обеспечение всех структур организма происходит с помощью нервных волокон и сигнальных молекул, поступающих к рецепторам клеточных мембран в клетках-мишенях. Последние не только информируют нейроны о своем состоянии, но и оказывают на них стимулирующее воздействие, инициируя в нейронах адекватные функциональные изменения и, следовательно, опосредуя обратное

воздействие на клетки мишени. При этом сама нервная система обеспечивает собственную трофику исключительно за счет сигнальных молекул, поступающих в нейроны от клеток-мишеней, которые они иннервируют. Все метаболические реакции, происходящие в многоклеточном организме, катализируются регуляторными белками-ферментами и протекают благодаря связыванию ферментов с субстратами. Такого рода реакции называются ферментативными.

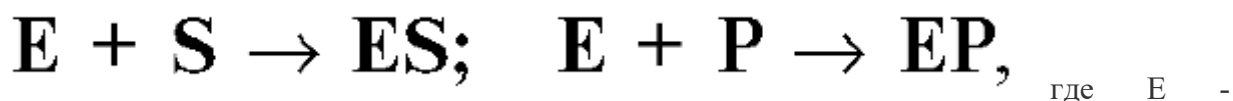
Ферменты и ферментативные реакции

Молекула фермента (энзима) способна к образованию активного центра или «кармана», в который попадает молекула субстрата и в котором она «атакуется» разными функционально активными группами.

Согласно закономерностям классической генетики, одна биохимическая реакция катализируется одним ферментом. В ее основе лежит формула, предложенная в 1941 году Дж. Бидлом и Э. Тейтемом: «Один ген - один фермент», которая потом трансформировалась в формулу: «Один ген - одна полипептидная цепь», длительное время считавшаяся центральной догмой молекулярной биологии (см. главу 1).

Необходимо отметить, что этот общий для энзимологии принцип и теперь достаточно часто соблюдается для многофункциональных ферментов и многоферментных систем (комплексов).

Протекающие в организме ферментативные реакции основаны на модели *Михаэлиса-Ментен*, которая учитывает все известные формулы генной экспрессии:



фермент; S - субстрат; ES и EP - комплексы фермента с субстратом S и фермента с продуктом P.

Таким образом, для одной ферментативной реакции необходимы как минимум субстрат и фермент. При этом субстратом могут быть молекулы ДНК, РНК, белка или другие молекулы, а ферментом - молекулы регуляторных белков. Ферментативные реакции сопровождают все альтернативные процессы в клетке и организме: прогресс и регресс, синтез и распад, развитие и инволюция (старение), возбуждение и торможение, сон и бодрствование и вообще любые другие молекулярные процессы (физикохимические, генетические и биохимические, морфологические, физиологические и патофизиологические), связанные с онтогенезом (см. главу 12).

Функции клетки и организма, обеспечиваемые с помощью ферментов

Как известно, ферменты обеспечивают многочисленные функции клетки и организма. Перечислим наиболее важные из ферментативных реакций. Это:

- экспрессия генов, производящих структурные и функциональные белки для клеток, тканей, органов и систем организма (реакции ДНК-мРНК-белок);
- защитные реакции организма: врожденный и приобретенный иммунитет, свертывание крови, действие цитохрома P₄₅₀ и др. (реакции фермент-белок, фермент-субстрат);
- узнавание молекул при их трансмембранном переносе (включая контроль потоков ионов), взаимодействии гормонов и других сигнальных молекул с рецепторами, генерации и проведении нервных импульсов и др. (те же реакции);

- умственная деятельность, работа мышечных клеток и др. (те же реакции). Кроме того, это также ферментативные реакции, происходящие между нуклеиновыми кислотами, начиная с этапа оплодотворения гамет. Например, в реакции ДНК-ДНК участвуют ферменты цитоплазмы яйцеклетки и ядерные факторы транскрипции, содержащиеся в яйцеклетке и сперматозоиде. Другие примеры - это реакции ДНК-мРНК в ходе транскрипции, реакции мРНК-рРНК, мРНК-тРНК в ходе трансляции, а также реакции

сайт-специфического связывания между аминокислотными остатками ферментов и нуклеотидными последовательностями ДНК.

ОСНОВНЫЕ СОБЫТИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Среди множества разных по биологической значимости событий внутриклеточного метаболизма в первую очередь следует рассмотреть основные «технологические» процессы, происходящие на молекулярном уровне, - это метаболизм пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, заменимых и незаменимых аминокислот, деградация ДНК и белков.

Метаболизм нуклеотидов

Нуклеотид - это соединение трех элементов: фосфат-сахар-основание. В этом соединении с образованием энергии связан фосфат. При этом центральную роль играет главный энергетический субстрат - АТФ, хотя другие энергетические соединения (GTP, CTP, UTP) также принимают участие. Углеводные компоненты нуклеотида представлены дезоксирибозой или рибозой. С ними через атом азота (N) в девятом положении пурина и первом положении пиримидина связаны азотистые основания, обеспечивающие передачу наследственной информации.

Азотистые основания нуклеотида - это пурины А и Г и пиримидины С, Т и У.

К ДНК-нуклеотидам (дезоксирибонуклеотидам) относятся: аденин (dAMP), гуанин (dGMP), цитозин (dCMP) и тимин (dTMP).

К РНК-нуклеотидам (рибонуклеотидам) относятся: адениловая (AMP), гуаниловая (GMP), цидиловая (CMP) и уридиловая (UMP) кислоты.

Синтез пуриновых нуклеотидов

Большинство клеток синтезируют пурины *de novo* из предшественников, имеющих небольшую молекулярную массу. Источниками свободных пуринов служат нуклеиновые кислоты, распадающиеся в лизосомах клетки при деградации молекулы ДНК, а местом их синтеза является печень.

Пуриновый цикл - это реакция риботилирования или присоединения комплекующих фрагментов к рибозо-5-фосфату. Этот

механизм характерен для синтеза пуринов *de novo*, свободных пуринов и пиримидиновых нуклеотидов при участии 5-фосфорибозил-1-пирувата (активная форма рибозо-5-фосфата) или фосфорибозил-1-пирофосфата (ФРПФ). Образование ФРПФ происходит по пентозофосфатному пути при переносе пирофосфатной группы (PP) с АТФ глутамина, катализируемого с помощью ФРПФ-синтетазы. Продукт этой реакции - 5-фосфорибозиламин. После его образования происходит ряд последовательных реакций (их всего 9), завершающихся сборкой первого пуринового нуклеотида, включающего гипоксантин, - это *инозиновая кислота* (IMP) .

Образование IMP служит своеобразным метаболическим перекрестком: из этой кислоты образуются аденин или гуанин.

В ходе указанных преобразований из NH^{10} -формилтетрагидрофолата или тетрагидрофолата (FH_4) также образуется формильная группа (FH) - это реакция формилирования. Участник реакции формилирования - тетрагидрофолат (FH_4) является коферментом витамина F или фолиевой (птероилглутаминовой) кислоты. FH_4 восстанавливается из гидрофолатредуктазы (FH_2) при участии NADPH и формилтрансферазы.

Формильная группа также поступает от серина, который в присутствии серингидроксиметилазы переносит гидроксиметильную группу (CH_2OH) на FH_4 , и в результате образуются глицин, вода и N^5N^{10} -метилен- FH_4 . Вместе с тем, последнее соединение еще не готово к участию в формилировании, так как метиленовая группа (CH_2) более восстановлена, чем формильная группа (FH). Поэтому CH_2 окисляется ферментом NADP^+ до метильного производного, которое после гидролиза превращается в N^{10} -формил- FH_4 , или донор формильной группы, необходимый для синтеза пуриновых нуклеотидов. Здесь уместно заметить, что синтез пуринов *de novo* не дает свободных пуринов, так как новые пурины сразу превращаются в пуриновые нуклеотиды. Известен также путь синтеза пуриновых нуклеотидов, в ходе которого в них превращаются свободные пурины, получаемые при распаде нуклеотидов и сохраняющиеся после взаимодействия с ФРПФ. В этом пути участвуют две фосфорибозилтрансферазы: одна катализирует образование пуриновых нуклеотидов из аденина, другая - из гипоксантина и гуанина. Причем во втором случае (синтез пуриновых нуклеотидов из гипоксантина или рибонуклеотида AMP, а синтез гуанина из рибонуклеотида GMP) принимает участие гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза

(ГГФРТ), которая, взаимодействуя с ФРПФ, образует IMP и неорганический фосфор (P). Для клеток человека сбережение аденина, по-видимому, менее важно, чем сбережение гипоксантина и гуанина. Свободный гипоксантин образуется из AMP при удалении фосфатной группы (PH) с помощью 5-нуклеотидазы и при этом превращается в аденозин, из которого удаляется NH_2 -группа с помощью фермента аденозиндезаминазы (АДА). В итоге аденозин превращается в инозин, из которого с помощью другого фермента - нуклеозидфосфоорилазы - образуются гипоксантин и рибозо-1-фосфат.

Следует также отметить, что при отсутствии в этом метаболическом пути АДА развивается аутосомно-рецессивная болезнь лимфоцитов (20q13.11), проявляющаяся тяжелым комбинированным иммунодефицитом (ТКИД). Предложенный в США в 1990 г. способ лечения ТКИД стал первым случаем применения в медицине метода генной терапии, суть которого заключалась во введении в стволовые клетки костного мозга *in vitro* нормального гена АДА и последующей аутотрансплантации этих клеток *in vivo* (см. главу 20).

В заключение необходимо подчеркнуть, что синтез пуриновых нуклеотидов требует от клетки больших энергетических затрат, и поэтому механизм реутилизации свободных пуринов более выгоден для нее, ибо позволяет клетке ограничить синтез *de novo*.

Кроме того, в организме имеются уникальные клетки (эритроциты), которые не способны синтезировать пурины *de novo*, и поэтому используют лишь готовые пуриновые основания. Значение механизма реутилизации свободных пуринов можно продемонстрировать на примере X-сцепленного рецессивного синдрома Леша-Найана (Xq26-27), связанного с умственной отсталостью, нарушениями координации и аутоагрессией (из-за отсутствия ГГФРТ). У таких больных в клетках печени резко увеличен синтез пуриновых нуклеотидов *de novo* (есть сахар и основание, но нет

фосфата), что ведет к увеличению уровня ФРПФ, образованию большого количества мочевой кислоты (в печени) и отложению кристаллов уратов (в почках).

Схожая симптоматика наблюдается при подагре, однако в этом случае у больных нет неврологических расстройств (по неизвестным пока причинам). По-видимому, подагра - это фенокопия синдрома Леша-Найана. При этом важно отметить, что мочевая кислота, образующаяся в печени из гипоксантина и гуанина, ингибируется аллопурином. Этот препарат применяется для лечения подагры, он вызывает преимущественное накопление не уратов, а гуанина

и гипоксантина, которые растворимы в воде и поэтому легко выводятся из организма.

Путь синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* - это пример аллостерического ингибирования по принципу обратной связи. При этом местом контроля ингибирования служит первая (обратимая) реакция синтеза пуринов. Ее катализирует ФРПФ-синтетаза, ингибируемая рибонуклеотидами AMP, ADP, GMP и GDP.

Синтез пиримидиновых нуклеотидов

Большинство клеток синтезирует пиримидиновые нуклеотиды *de novo*. Вместе с тем, известен путь реутилизации свободных пиримидинов, который менее ярок, чем у пуринов.

Синтез свободных пиримидинов начинается с аспарагиновой кислоты и ведет к образованию оротовой кислоты (соединение с циклической структурой), которая в присутствии ФРПФ и под действием киназ преобразуется в урацил (UMP).

В ходе сбалансированного производства дезоксинуклеотидтрифосфатов (так же, как пуринов) осуществляется аллостерическая регуляция по принципу обратной связи (см. главу 8). Их восстановление идет на уровне дифосфатов при помощи NADPH (переносит электроны на редуктазу). Только после этого они в несколько стадий превращаются в трифосфаты (в результате фосфорилирования киназами с участием АТР). Сначала не участвующий в синтезе dUTP (он содержит тимин) гидролизует в dUMP с образованием PP. Затем dUMP метилируется в dTMP.

Метилирование - это перенос обладающей высокой активностью метильной группы (CH₃) от донора-метионина на молекулы других соединений, включая ДНК (см. ниже). При этом нуклеозид-тимидин ресинтезируется до ТМП под действием тимидинкиназы.

Метилирование dUMP происходит также под действием фермента тимидилатсинтетазы, коферментом которой является N⁵N¹⁰-метилен- FH₄ или метилентетрагидрофолат (FH₄). Далее dTMP фосфорилируется в dTTP (метилированный урацил), который превращается в dTTP.

В случае синтеза пуринов метиленовая группа (CH₂) окисляется с образованием формильной группы (см. выше), а в случае синтеза тимидилата она восстанавливается и переносится к метильной группе (CH₃) тимина в присутствии тимидилатсинтетазы. При этом FH₄ превращается в FH₂. Для обратной восстановительной реакции необходим фермент дегидрофолатредуктаза, с дефицитом которого связано появление одной из генокопий фенилкетонурии (см. ниже).

Другой метаболический путь - это превращение FH₄ в метилен- FH₄ в реакции с серином, но для этого FH₂восстанавливается до FH₄ под действием дегидрофолатредуктазы.

Показано, что антифолатами или структурными аналогами фолата, ингибирующими FH₂-редуктазу, служат антилейкемические препараты: аметоптерин и аминоптерин, которые подавляют образование dTMP, крайне необходимого лейкозным клеткам. Причем

образование dTMP идет по пути ингибирования FH₂-редуктазы и торможения процесса превращения FH₂ в FH₄. Далее фермент серингидроксиметилаза способствует образованию метилен-FH (из фолиевой кислоты), а затем в присутствии dUMP образуется dTMP.

Кроме этих реакций, известна реакция, в ходе которой N⁵N¹⁰- метилен-FH₄ восстанавливается до N⁵-метилен-FH₄, который поставляет метильные группы для превращения гомоцистеина в метионин в присутствии метионинсинтетазы.

Метионинсинтетазе необходим кофактор - витамин B₁₂, при полном отсутствии которого развивается аутосомно-рецессивная пернициозная анемия (6p12-p21.2). При этом заболевании в организме не образуется желудочный гликопротеин, необходимый для восстановления в кишечнике витамина B₁₂, хотя с пищей его поступает много. В связи с этим запасы FH₄ становятся недоступными для синтеза пуринов, и тетрагидрофолат превращается в метил- FH₄, вызывая у больных неврологические расстройства, связанные с метилмалоновым ацидозом. При дефиците витамина B₁₂ развивается аутосомно-рецессивная врожденная мальабсорбция фолата (мегалобластная анемия). Один из ее генов-кандидатов картирован на 11q13.3-q14.1.

Известны две реакции, зависящие от витамина B₁₂. Они катализируются разными ферментами: метилмалонил-КоА-мутазой (6p12- p21.2) и метионинсинтазой (ген не картирован). При недостатке первого фермента развивается смертельный ацидоз, тогда как недостаток второго фермента вызывает только раннюю задержку психомоторного развития, сопровождающуюся неврологической симптоматикой, обусловленной токсическим действием гомоцистеина.

Метилирование последовательностей ДНК

Метилирование последовательностей ДНК (например, остатков цитозина в положении 5) происходит с образованием 5-метилцитозина (5-mC) при действии ряда ферментов, получивших общее название: цитозин-ДНК-метилтрансфераз или М-таз.

М-таза - это «поддерживающий» фермент, узнающий и метилирующий только наполовину метилированные последовательности ДНК, формирующиеся в ходе репликации, когда вновь синтезированная дочерняя цепь еще не метилирована. Известны четыре таких фермента (Dnmt 1, Dnmt 2, Dnmt 3a и Dnmt 3b). Наиболее изучен Dnmt 1 или белок с молекулярной массой около 190 кДа, имеющий 2 домена: *каталитический* (расположен в С-концевой части фермента), структурно близкий к бактериальным цитозиновым М-тазам, и *регуляторный* (расположен в N-концевой части), содержащий сигнальную последовательность, направляющую фермент в активные репликативные комплексы в делящихся клетках.

Ферментативная активность Dnmt 1 резко возрастает с началом синтеза ДНК. Возможно, что промотор гена этого фермента активируется продуктом гена H-ras, участвующим в переносе митогенного сигнала.

Показано, что остатки цитозина в основном метилируются в составе динуклелидов CpG, или CpG-островков (см. главы 1 и 25). Всего в геноме эукариот метилируется около 70% CpG-островков и 6-7% остатков цитозина. Такое поддерживающее метилирование отражено на рис. 32: в результате репликации метилированные динуклеотиды CpG присутствуют в материнской нити ДНК. ДНК-метилтрансфераза распознает в ней метилированные CpG и воссоздает тот же рисунок метилирования в дочерней нити. Следует отметить, что М-тазы обладают лишь ограниченной способностью метилировать последовательности ДНК de novo в полностью неметилированных участках и

метилировать олигонуклеотиды, содержащие ошибочно спаренные основания (см. главу 10).

В настоящее время клонированы гены, продукты которых проявляют высокую способность к метилированию ДНК *de novo* и, возможно, ответственны за этот процесс.

Метилирование остатков цитозина влияет на структурные характеристики ДНК, что проявляется в облегчении перехода ее метилированных участков из В-формы в Z-форму, увеличении шага спирали ДНК и изменении кинетики образования крестообразных структур. При этом метильная группа 5-mC выступает на поверхности большой бороздки ДНК, находящейся в В-форме, что увеличивает ее гидрофобность и в ряде случаев становится решающим фактором взаимодействия ферментов с соответствующими участками молекулы ДНК. Кроме того, показано метилирование других последовательностей ДНК, например CpNpG, а также опи-

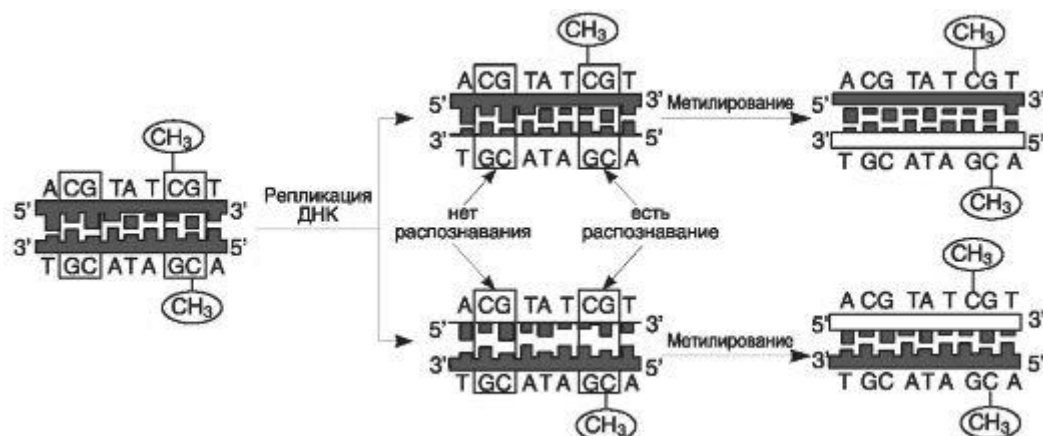


Рис.

32. Поддерживающее метилирование в геноме (по: Herman et al., 1999; <http://www.kletca.ru/stem-cells/glossary/>)

сан механизм метилирования аденина и гуанина - это метилирование с помощью сульфониевого катиона S-аденизилметионина или SAM. В частности, механизм метилирования гуанина в положении 7 (N⁷-метилгуаниновая группа), а также в положении 2 (группа OH второго и иногда третьего нуклеотида) играет важную роль в экспировании мРНК с помощью РНК-полимеразы II или модификации мРНК с 5'-конца. В этом месте в составе первого нуклеотида имеется трифосфатная группа, и ее концевой фосфат удаляется с заменой на остаток GMP. Благодаря этому экспированная мРНК достраивается до функционально активной мРНК. Кроме метилирования аденина и гуанина, для SAM показано метилирование аминокислот и других веществ: креатина, ФХ и адреналина (относится к катехоламинам).

Деградация ДНК

Деградация ДНК - это универсальная для большинства клеток замена в ходе репликации старых молекул на новые. Процесс деградации ДНК считается необратимой терминальной стадией апоптоза, которая контролируется белками семейства Bcl-2 (см. главу 11).

Деградация мРНК

Выделено 2 механизма деградации мРНК (процессы NMD и SMD), относящихся к восстановительным механизмам клетки (см. главу 10).

На рис. 33 приведена схема механизма - NMD у млекопитающих: процесс NMD происходит во время трансляции, и с его помощью разрушается мРНК, содержащая *преждевременные стоп-кодоны* (ПСК), что прерывает трансляцию на

расстоянии 50-55 нуклеотидов вперед по ходу считывания экзон-экзонной последовательности, возникшей в результате сплайсинга.

Предшественник мРНК (пре-мРНК) в ядре связан с гетеродимером CBP80 - CBP20 главного ядерного кЭП-связывающего белка (CBP).

После формирования 3'-конца пре-мРНК соединяется с ядерным поли (А)-связывающим Upf3а-белком или PABP?-белком (PABP). Затем пре-мРНК подвергается сплайсингу и превращается в мРНК,

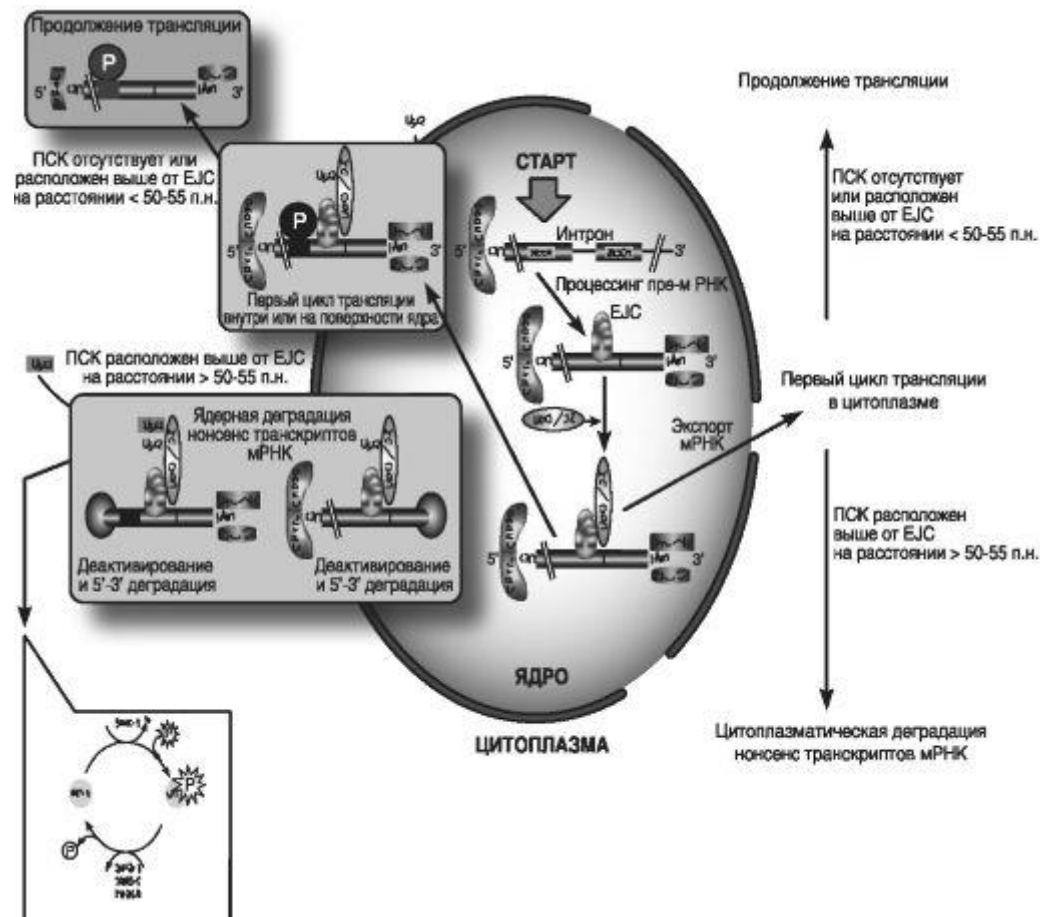


Рис.

33. Схема NMD у млекопитающих (по Maquat L., 2005)

которая связывается с комплексом, включающим CBP80-CBP20, PABPN1 и цитоплазматический белок PABPC, и после этого присоединяется к белкам экзон-экзонного комплекса или EJC, находящегося на расстоянии 20-24 нуклеотида вперед. Компонентами EJC служат ряд белков, включая:

- белки сплайсинга пре-мРНК (Pnn/DRS, RNPS1, SRm160, UAP56);
- белки, участвующие в экспорте мРНК (REF/Aly, Y14, Magoh);
- белки, функции которых полностью не выяснены (PYM, eIF4AIII и Barentsz/MLN512).

К комплексу EJC также могут присоединяться дополнительные белки:

- факторы NMD (Upf3 или Upf3a, Upf3X или Upf3b, Upf2);
- белок Upf1 (присоединяется, по-видимому, транзиторно).

Как полагают, белки Upf3/Upf3X, имеющие преимущественно ядерную локализацию, способны перемещаться в цитоплазму и взаимодействовать с белком Upf2, который сконцентрирован вдоль цитоплазматического края ядерной оболочки. При их перемещении образуется *инициирующий комплекс первичной трансляции* или мРНКП. Этот комплекс проходит первичный цикл трансляции либо в ассоциации с ядром, либо с цитоплазмой, так как мРНК служит ассоциированным с ними субстратом для NMD.

Процесс NMD происходит после распознавания ПСК во время первого цикла трансляции. Если трансляция прерывается в ПСК, который находится на расстоянии более чем 50-55 нуклеотидов выше от экзон-экзонного соединения, то Upf1 инициирует процесс NMD путем взаимодействия с белком Upf2, ассоциированным с EJC.

Непосредственная деградация нонсенс-транскриптов в клетках млекопитающих происходит как в направлении 5' - 3', так и 3' - 5', включая соответственно декэпирование и действие 5' - 3' экзонуклеотических факторов или же деаденилирование и действие 3' - 5' экзосомальных факторов.

Участие EJC-комплексов в процессе NMD подтверждается данными о том, что мРНК, содержащие ПСК, и мРНК, происходящие из генов, не содержащих интроны, не подвергаются NMD. Мишенью для NMD служат только вновь синтезированные мРНК, тогда как стабильные мРНК не подвергаются деградации.

Для NMD показано разрушение ряда нонсенс-транскриптов, включая:

- мРНК, относящуюся к продуктам альтернативного сплайсинга;
- мРНК, необходимую для селенопротеинов;
- мРНК с открытой рамкой считывания;
- мРНК, содержащую интрон в 3'-нетранслируемой области гена. В случае цитоплазматической деградации пока не ясно, происходит

ли NMD в комплексе с рибосомами, транслирующими белки, или цитоплазматическими внерибосомными участками деградации мРНК.

Эффективность NMD, как правило, не зависит от локализации ПСК и увеличения количества EJC-комплексов. Однако эффективность NMD может быть повышена за счет других механизмов, например за счет моделирования (замены) различных последовательностей генов.

В настоящее время продолжает изучаться роль NMD в других клеточных процессах. Например, один из его факторов - SMG1 - принимает участие в распознавании и/или репарации повреждений ДНК, другой фактор - Upf1 - участвует в нонсенс-опосредованном альтернативном сплайсинге, а также в недавно открытом новом пути деградации мРНК - так называемой опосредованной деградации мРНК или SMD. В случае SMD-механизма деградации РНКсвязывающий белок напрямую взаимодействует с белком Upf1, вызывая деградацию мРНК на достаточно удаленном расстоянии от ПСК, включающем нормальный стоп-кодон.

Вместе с тем, для SMD-механизма окончательно не определено функциональное назначение указанных факторов.

Метаболизм аминокислот и его нарушения

Аминокислоты образуются из кетокислот и аммиака (аминогруппы). Они используются для синтеза различных белков, в том числе компонентов клеточных мембран, нейромедиаторов (например, 5-гидрокситриптамина и гамма-аминобутирата или ГАБА), гормонов (например, тироксина), гема и других веществ. Источниками аминокислот служат пищевые продукты и продукты клеточного метаболизма.

Основные аминокислоты делятся на:

- незаменимые (поступают исключительно извне), их 10;
- заменимые (поступают извне и синтезируются в организме), их также 10.

Только одна аминокислота - аргинин - необходима организму в течение ограниченного периода развития (исключительно во время его роста), тогда как остальные 19 аминокислот необходимы всегда.

Абсолютно необходимыми считаются лизин, фенилаланин и триптофан. Цистеин можно получить из фенилаланина, а тирозин - из метионина. Основные аминокислоты либо кетогенны (образуют ацетил-СоА, который превращается в кетоновые тела), либо гликогенны (увеличивают уровень глюкозы в крови, а у диабетиков в моче). Вместе с тем, лейцин и лизин относятся и к тем и к другим (кетогенным и гликогенным).

На рис. 34 приведена общая схема метаболизма аминокислот. Как показано на схеме, избыток аминокислот формируется за счет аминокислотных остатков, не использованных в биосинтезе белков или на другие нужды клетки.

Сформировавшийся избыток аминокислот в виде метаболического фонда используется (при их расщеплении) для производства энергии и создания энергетических запасов (жиров и гликогена), а аминный азот выводится с мочой в виде мочевины.

В случае необходимости резервами для производства аминокислот могут стать функциональные мышечные белки (их в организме больше всего). У человека выявлен целый ряд наследственных болезней, связанных с нарушениями метаболизма аминокислот (см. главу 21). Для больных с такими нарушениями характерен либо дефицит, либо избыток какой-либо определенной аминокислоты, что ведет к пло-

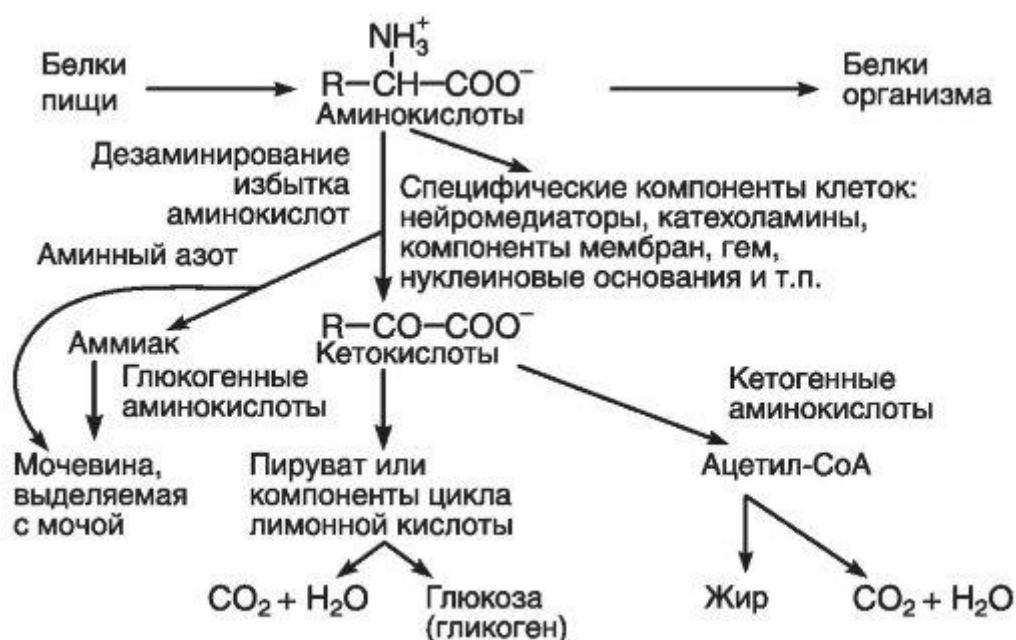


Рис.

34. Общая схема метаболизма аминокислот (по Эллиот В., Эллиот Д., 2002)

хому перевариванию и всасыванию пищи, истощению организма, задержке психомоторного и физического развития, отекам тканей, неврологической и другой симптоматике, базирующейся на синтезе неполноценных белков.

Наиболее характерным примером этих заболеваний служит аутосомно-рецессивная фенилкетонурия (ФКУ), развивающаяся в результате дефицита фермента фенилаланин-4-гидроксилазы

(12q24.2).

ФКУ имеет ряд генокопий (чаще всего злокачественных), развивающихся в результате дефицита 6-пирувоилтетрагидроптерин-синтазы (11q22.3-q23.3), цитозольной дигидроптеридинредуктазы (4p15.31), цитозольной гуанозин-циклогидролазы (ген не картирован) или тетрагидробиоптерина - кофактора ВН₄гидролаз ароматических аминокислот: фенилаланина, тирозина и триптофана (ген также не картирован).

Сюда же относится генокопия ФКУ вследствие дефицита дегидрофолатредуктазы.

Прежде чем рассмотреть механизмы патогенеза генокопий фенилкетонурии, отметим, что в нормально функционирующем организме фенилаланин не подвергается дезаминированию, а превращается в тирозин (под действием фенилаланин-4-гидроксилазы).

При ФКУ синтез тирозина затруднен либо полностью заблокирован, и фенилаланин «вынужденно» подвергается дезаминированию в фенилпируват (кетокислота), который выводится с мочой.

В связи с этими особенностями обмена фенилаланина в организме и наличием генокопий ФКУ был проведен анализ состава свободных аминокислот и результатов метаболизма фенилаланина в плазме крови небеременных и беременных женщин - носителей гена ФКУ (Васильева О.В., 1999). Состав свободных аминокислот в сыворотке крови у небеременных (*первая группа*) характеризовался соотношением заменимых и незаменимых аминокислот 38 и 62% соответственно, а также отношением гидрофобных и нейтральных к другим аминокислотам, составляющим 71 к 29%. Отмечались наибольшие концентрации аланина, треонина, лизина и аргинина; наименьшие - аспарагиновой и глутаминовой кислот.

При анализе корреляционных связей между количественными характеристиками аминокислотного спектра были выделены три степени сопряженности количественных показателей взаимно корре-

лируемых систем: высокие, средние и низкие уровни объединения аминокислот.

Соответственно, высокие уровни - это лизин, фенилаланин и тирозин; средние уровни - это гистидин, цистеин и валин; низкие уровни - это лейцин, изолейцин, метионин, аланин и аспарагиновая кислота. Кроме этих трех уровней, были выделены уровни корреляционных связей, характерные для аргинина и глутаминовой кислоты, а также серина и треонина. Полученные данные были объяснены автором структурно-функциональными особенностями аминокислот:

- фенилаланин является предшественником тирозина;
- фенилаланин, тирозин и лизин участвуют в синтезе ацетил-СоА без промежуточного образования пирувата;
- аргинин, гистидин и валин могут участвовать в синтезе глутаминовой кислоты;

- лейцин, изолейцин и метионин относятся к гидрофобным аминокислотам;
- аланин образуется при переаминировании пирувата, который может стать основой для синтеза глицина; донором аминогруппы служит аспартат.

Физиологическая беременность приводила к изменениям фонда свободных аминокислот за счет снижения содержания в первом триместре-глицина, валина, лейцина; во втором триместре-гистидина, фенилаланина и цистеина. Если по данным массового (пилотного) скрининга беременных уровень фенилаланина в плазме крови соответствовал 1,2 мг%, то это оценивалось как критерий отбора женщин в группу «потенциальных гетерозигот» по гену ФКУ.

Если экспрессия скрытого в материнском организме гена ФКУ приводила в первом триместре беременности к возрастанию уровня фенилаланина в плазме крови выше 10 мг%, то это оценивалось как причина нарушений развития плода.

Облигатное гетерозиготное носительство гена ФКУ у матерей, родивших детей с ФКУ (*вторая группа*), в сравнении с женщинами без гена ФКУ (*третья группа*) проявлялось нарушениями метаболического фонда аминокислот в виде высокой концентрации глутаминовой и аспарагиновой кислот, треонина и глицина.

Отмечая большое теоретическое и практическое значение работы О.В. Васильевой, можно сделать вывод, что имеющиеся сегодня представления о спектре и механизмах проявления различных генокопий

ФКУ (а возможно, и генокопий при других наследственных болезнях обмена - НБО аминокислот) должны быть значительно расширены. Это может быть сделано не только за счет анализа фонда всех аминокислот, объединенных в отдельные группы в зависимости от степени сопряженности с их структурно-функциональными характеристиками, но и на основе анализа роли белков-ферментов, участвующих в метаболизме этих аминокислот. В пользу такого вывода свидетельствует также пример аутосомно-рецессивного лейциноза или болезни мочи «кленового сиропа», при которой выделены три генокопии, обусловленные дефицитом фермента: дегидрогеназы альфа-кетокислот с разными боковыми цепями, тип I A (19q13.1-13.2), тип I B (6p21-p22) и тип II (1p31). Лейциноз развивается в результате нарушения окислительного декарбоксилирования альфа-кетокислот, сопутствующих образованию алифатических аминокислот: лейцина, изолейцина и валина.

Завершая рассмотрение данных о значении метаболизма отдельных аминокислот, важно отметить, что наряду с дефицитом может наблюдаться их избыток, и тогда у больных диагностируются, например, такие заболевания, как:

- *алкаптонурия* (3q2) - результат нарушенного расщепления тирозина из-за избытка гомогентизиновой кислоты, являющейся его продуктом дифенолом; в этом случае дифенол соединяется с кислородом воздуха и образует пигмент, благодаря которому моча окрашивается в темный цвет;
- *цистатионурия* (16q) - это избыток цистатиона (см. ниже).

Синтез аминокислот

Предшественниками основных аминокислот являются 5 химических соединений: альфа-кетоглутарат, 3-фосфоглицерат, оксалоацетат ($R = CH_2COO$), фосфоенол-пируват, пируват ($R = CH_3$) и два моносахарида пентозофосфатного пути. Рассмотрим механизмы их преобразования в аминокислоты.

Аминокислоты как продукты метилирования

Аминокислоты могут быть продуктами метилирования или переноса метильной группы от донора-метионина на различные соединения (см. выше). Когда метионин реагирует с АТР, то его NH_3^+ -группа активируется с образованием сульфониевого катиона, или S-аденизилметионина (SAM). Перенос метильной группы катализируется трансметилазами.

В ходе этой реакции три фосфатные группы АТР превращаются в пиррофосфат (PP) и неорганический фосфор (P), затем PP расщепляется до двух молекул P.

Сначала SAM превращается в S-аденозилгомоцистеин, который превращается в гомоцистеин-метионин (у него вместо группы S-CH_3 имеется SH-группа, или тиольная группа). Далее тиольная группа с гомоцистеина переносится на серин с образованием цистеина. Промежуточным соединением в этой реакции является цистатион, избыток которого выводится с мочой.

Продуктами метилирования SAM также являются: креатин, фосфолипид - ФХ и катехоламин - адреналин.

Аминокислоты как продукты трансаминирования

Аминокислоты могут быть продуктами трансаминирования или дезаминирования. Например, глутаминовая кислота синтезируется с помощью глутаматдегидрогеназы, кофакторами которой являются NAD^+ и NADP^+ . Эта реакция обратима.

Донорами глутаминовой кислоты служат аспарагиновая кислота и аланин, образующиеся при трансаминировании оксалоацетата и пирувата. Глутаминовая кислота дезаминируется путем отщепления двух атомов водорода в присутствии глутаматдегидрогеназы, использующей в качестве окислителя NAD^+ или NADP^+ . Этот фермент аллостерически ингибируется АТР и GTP (они указывают на большие запасы энергии), но активируется ADP и GDP (они указывают на недостаток энергии).

После дезаминирования глутаминовой кислоты образуется альфакетоглутарат, который участвует в *цикле Кребса* (цикл лимонной кислоты), что делает возможным окисление глутаминовой кислоты

до H_2O и CO_2 .

Поскольку альфа-кетоглутарат превращается в оксалоацетат, он может участвовать в синтезе глюкозы, т.е. глутаминовая кислота - это гликогенная аминокислота.

Для других аминокислот (кроме глутаминовой) нет соответствующих дегидрогеназ. Поэтому их дезаминирование идет не в одну, а в две стадии: первая стадия - переаминирование, вторая стадия - дезаминирование. В целом этот общий для всех аминокислот метаболический путь называется трансаминированием или дезаминированием.

Трансаминирование катализируется аминотрансферазами (трансаминазами), которые специфичны для разных аминокислот.

В активных центрах трансаминаз находится кофермент пиридоксаль-5-фосфат (ПФ), выступающий в роли электрофильного интермедиатора, который сначала принимает аминогруппу

(служит ее акцептором), а затем (как донор) передает ее кетокислоте.

Рабочей группой ПФ является альдегидная группа (CHO) .

ПФ включает три производных витамина B₆: пиридоксаль, пиридоксин и пиридоксамин.

Механизм трансаминирования можно продемонстрировать на примере аланина, являющегося транспортной формой аминного азота в крови.

В аланине сосредоточено около 30% аминного азота, поступающего в печень после расщепления мышечных белков и образующегося из пирувата при трансаминировании других аминокислот.

При взаимодействии аланина и альфа-кетоглутарата возникает пируват, который вступает в реакцию с глутаматом, - это *первая стадия*. Во *второй стадии* глутамат присоединяет NAD⁺ и воду, образуя кетоглутарат, который взаимодействует с NaPH⁺ и NH₄. В печени аланин дезаминируется. Образующийся при этом аммиак идет на синтез мочевины, а пируват - на синтез глюкозы, которая возвращается с кровью в мышцы, замыкая глюкозо-аланиновый цикл переноса аммиака. Этот цикл приобретает особое значение при голодании, когда в ходе глюконеогенеза в печени используются аминокислоты, образующиеся при расщеплении мышечных белков.

Синтез серина и глицина

Серин синтезируется в три стадии из гликозила-3-фосфатглицерина, который сначала окисляется в кетокислоту (трифосфатгидроксипируват); она трансаминируется глутаминовой кислотой и превращается в 3-фосфат-серин, гидролизующийся до серина и неорганического фосфора.

Глицин синтезируется путем удаления из серина гидроксиметильной группы (см. выше). Реакция идет с участием тетрагидрофолиевой кислоты, являющейся переносчиком моноуглеродных групп.

Такого рода перенос важен для синтеза нуклеотидов.

Синтез других аминокислот

Глутамин (так же как аланин) служит транспортной формой аммиака в крови, который образуется при дезаминировании аминокислот.

Аммиак токсичен и поэтому в печень поступает не в свободном виде, а в соединении с глутаминовой кислотой, образуя при участии фермента глутаминсинтетазы амид глутаминовой кислоты, или

глутамин. В качестве промежуточного продукта образуется гаммаглутамилфосфат (ангидрит глутаминовой и фосфорной кислот) - это макроэргическое соединение, способное взаимодействовать с ионами аммония при участии синтетазы (см. главу 8).

Источником глутамина служит альфа-кетоглутарат из цикла Кребса, подвергающийся трансаминированию другими аминокислотами.

Глутамин переносится кровью в печень, где гидролизует глутаминазой, а высвобождающийся при этом аммиак используется для синтеза мочевины.

Фенилаланин - это ароматическая аминокислота, избыток которой в нормально функционирующем организме превращается в тирозин при участии фенилаланин-4-гидроксилазы, поставляющей 2 атома водорода от кофермента - тетрагидробиоптерина (см. выше).

Лейцин, изолейцин и валин - это алифатические аминокислоты, промежуточные продукты которых накапливаются в виде кетокислот при лейцинозе (см. выше).

Метаболизм других соединений из аминокислот

Кроме белков, из аминокислот образуются: амины (в результате декарбоксилирования); катехоламины или гормоны, сходные по структуре с катехолом (например, 1,2-дегидроксибензол), включая дофамин, адреналин и норадреналин; нейромедиаторы (ГАБА и 5-окситриптамин), а также гормон - тироксин.

Аминогруппы после их удаления из аминокислот выводятся с мочой в виде мочевины - это инертное водорастворимое нетоксическое соединение.

Мочевина образуется в печени при отщеплении гуанидиновой группы от аргинина. При этом попутно образуется аминокислота - орнитин, не входящая в состав основных белков организма.

Для превращения орнитина обратно в аргинин используются атом углерода, получаемого из углекислого газа, и аминный азот, выделяемый в ходе метаболизма любой из основных аминокислот.

Образование аргинина из орнитина идет в несколько стадий. В качестве промежуточного продукта образуется аминокислота - цитруллин, также не входящая в состав основных белков организма; она стимулирует синтез мочевины в печени (как орнитин и аргинин).

Деградация белков

Деградация белков - это замена старых белковых молекул на новые молекулы. Она происходит во всех клетках и тканях организма в ходе метаболизма. Белки имеют различную продолжительность жизни. К белкам-долгожителям относятся структурные белки и гемоглобин. Несколько дней живут белки печени.

Многие белки имеют продолжительность жизни не более 20 ч, а часть из них живут не более десяти или даже двух минут.

В связи с разной продолжительностью жизни белков их деградация характеризуется высокой селективностью.

В ходе синтеза аминокислот и последующего производства из них структурных и регуляторных белков их абсолютная структурная (и функциональная) точность не всегда соблюдается. Поэтому в клетках неизбежно образуются ошибочные аминокислоты, что влечет за собой неправильный фолдинг белков (см. главу 3), и такие белки уничтожаются клеткой, т.е. подвергаются процессу деструкции. Для селективной деструкции важен белок - убиквитин. Это небольшой белок, участвующий в АТР-зависимой реакции, при которой его концевая карбоксильная группа связывается с аминокислотной группой боковой цепи белка-мишени (остатками лизина), который должен подвергнуться деструкции, т.е. он как бы «метится» для нее.

Выбор убиквитином белков для уничтожения, по-видимому, определяется их N-концевыми аминокислотными остатками. В мечении также могут участвовать белки - молекулярные шапероны (см. главу 3).

В деградации долгоживущих белков принимают участие лизосомы цитоплазмы, ответственные за аутолитическую деструкцию клеток в ходе их регресса. Деградация клеточных белков жизненно необходима при голодании организма, когда распадаются мышечные белки, за счет которых может происходить глюконеогенез аминокислот.

ГЛАВА 8 ПУТИ И МЕХАНИЗМЫ УПРАВЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМОМ

Регуляция активности ферментов

Поскольку все протекающие в клетке метаболические реакции катализируются ферментами, то пути и механизмы управления метаболизмом сводятся к регуляции уровней метаболитов или активности ферментов. В целом регуляция активности ферментов обеспечивается взаимодействием генных, метаболических (энергетических и трофических), нервных, гормональных и иммунных реакций, а также с помощью огромного количества нервных окончаний (синапсов) в органах и тканях и клеточных рецепторов, реагирующих на действие постоянно поступающих к ним сигнальных молекул (нейромедиаторы, гормоны, факторы транскрипции и т.д.).

В первую очередь эффективность регуляции метаболизма зависит от адекватного питания и трофики отдельных клеток и целого организма, а также активности (интенсивности) происходящего в них обмена веществ. Цель такой регуляции заключается в поддержании баланса между химическими реакциями в системе «синтез-распад» (см. главу 7).

Возникает вопрос: какие ферменты метаболического пути следует регулировать? Ответ давно известен - ферменты, расположенные в стратегически важных местах: на необратимой стадии в целом обратимого процесса.

Стратегический пункт контроля - это, как правило, первый фермент метаболического пути.

В качестве примера следует привести ранее рассмотренную первую обратимую реакцию синтеза пуриновых нуклеотидов, которую катализирует ФРПФ-синтетаза, ингибируемая AMP, ADP, GMP и CMP. Затем образуется 5-фосфорибозиламин и далее следует каскад из 9 реакций, завершающихся сборкой пуринового нуклеотида, содержащего гипоксантин - молекулу инозиновой кислоты, которая преобразуется либо в аденин, либо в гуанин.

Другой пример - регуляция через обратную связь (ингибирование конечным продуктом).

В молекулярной биологии существует ряд способов регуляции активности ферментов (путей и механизмов управления метаболизмом).

Основные способы регуляции относятся к обратимому влиянию на скорость ферментативных реакций путем изменения количества фермента или его каталитической активности.

Дополнительные способы регуляции относятся к необратимой активации ферментов.

Рассмотрим сначала наиболее значимые для жизни клетки и организма основные способы - это аллостерическая регуляция и ковалентная модификация белка.

Первый способ относится к механизмам внутреннего (внутриклеточного), а *второй способ* - к механизмам внешнего (внеклеточного) управления метаболизмом. В этом случае часто используется старое название: фосфорилирование и дефосфорилирование.

Аллостерическая регуляция и основные секреты молекулярной жизни

Аллостерическая регуляция происходит внутри клетки и определяется избирательным связыванием аллостерических регуляторов фермента с субстратом.

Приставка «алло» означает «другой». Она подразумевает наличие на ферменте (кроме участка связывания субстрата) еще одного или нескольких участков для связывания лигандов или низкомолекулярных соединений (небольших белков).

Лиганды - это аллостерические эффекторы или регуляторы. Обычно они не похожи на субстрат, но их действие происходит при определенной концентрации субстрата.

Как правило, эффекторы управляют аллостерической реакцией, но ее регуляторами могут быть и сами метаболиты.

Положительные эффекторы увеличивают активность фермента - это активаторы, отрицательные эффекторы ее понижают - это ингибиторы. Аллостерическая реакция мгновенна, но она обратима, когда концентрация фермента в среде уменьшается и становится прежней.

Следует отметить, что существование клетки как сложной биологической системы было бы нереальным без аллостерической регуляции. Именно этот механизм «открыл для эволюции» возможность создавать множество информационных каналов (каналов связи), которые позволяют получать сигналы из любой точки метаболических событий, происходящих в клетках и организме в целом.

Практически сразу после своего открытия аллостерическая регуляция была названа вторым секретом молекулярной жизни. Безусловно, что первым секретом является сама молекула ДНК и главное свойство содержащихся в ней генов - их экспрессия, благодаря которой синтезируются различные белки - носители многочисленных биологических функций (признаков) клетки и организма. Причем не должно быть никаких сомнений, что белки - еще один из секретов молекулярной жизни, а третий он или иной по значимости - не столь принципиально!

Примерами внутреннего управления метаболизмом являются: регуляция обмена гликогена, гликолиза и глюконеогенеза, уровня пируватдегидрогеназы, концентрации лимонной кислоты (цикл Кребса), активности окислительного фосфорилирования, процессов окисления и синтеза жирных кислот, переноса электронов в митохондриях. Таким образом, управление метаболизмом внутри клетки обычно (но далеко не всегда) осуществляется с помощью аллостерической регуляции, цель которой - избежать дефицита или перепроизводства необходимых для жизни клетки веществ, т.е. поддержать их баланс.

Ковалентная модификация белка

Ковалентная модификация белка - это третий по значимости, но уже внешний способ обратимой регуляции активности ферментов.

В его основе лежит механизм переноса (с помощью протеинкиназы) фосфатного остатка с аденозинтрифосфата (АТФ) на гидроксильную группу (НО) одного из остатков аминокислоты - серина. В результате изменяется конформация регуляторных белков (соотношение между молекулами киназ и фосфорилаз), что улучшает их каталитические свойства (рис. 35).

Лигандзависимая внешняя сигнализация

Внешнее управление метаболизмом осуществляется также с помощью агонист ов (в том числе лигандов), находящихся снаружи клетки.

При такой регуляции лиганд разносится током крови по всему организму, но влияет только на свои клетки-мишени. Если клетка не имеет рецепторов к лиганду, то она «не

видит» предназначенный ей сигнал и ионный канал не открывается (рис. 36). Если же клетка имеет соответствующие рецепторы, то она «видит» сигнал и ионный канал открывается.

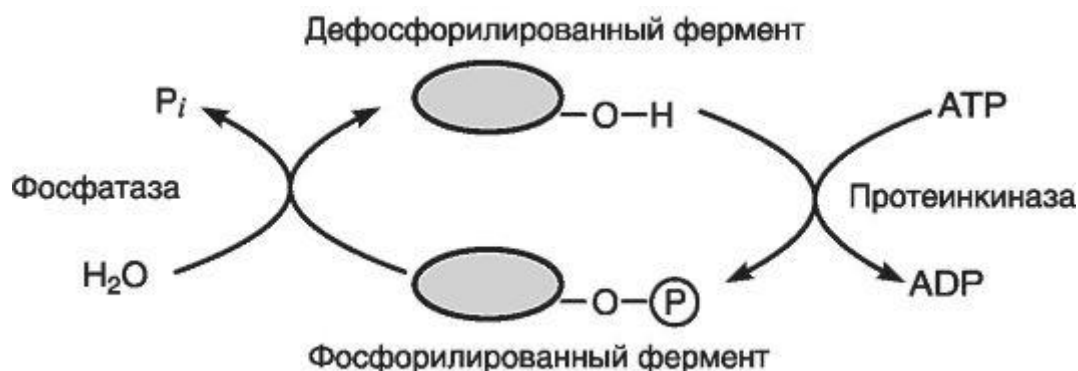


Рис.

35. Регуляция активности фермента посредством фосфорилирования (по Эллиот В., Эллиот Д., 2002)

Именно так работает рецептор ацетилхолина, открывающий лигандзависимый Na^+/K^+ -канал (см. главу 13). При связывании ацетилхолина этот канал открывается, позволяя ионам Na^+ двигаться в клетку, а ионам K^+ выходить из клетки. При этом первые ионы (из-за более высоких концентраций) входят в клетку быстрее, чем вторые ионы выходят из нее, что приводит к уменьшению отрицательного заряда внутри клетки и вызывает деполяризацию плазматической мембраны вблизи ацетилхолиновых рецепторов синапса. В результате стимулируется распространение нервного импульса, идущего

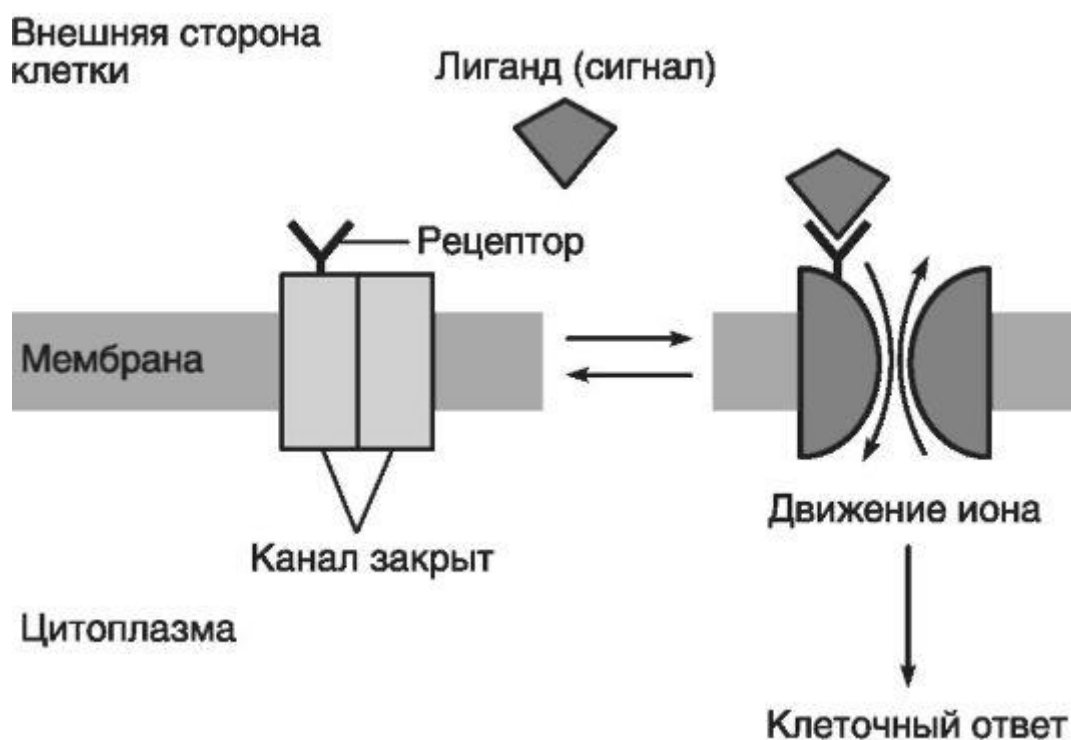


Рис.

36. Лигандзависимый ионный канал (по Эллиот В., Эллиот Д., 2002)

по нервному волокну, но оно (распространение) идет уже с участием ионных каналов другого типа, называемых потенциалзависимыми Na^+/K^+ -каналами, открывающимися при нарушении потенциала покоя. Примерами внешнего лигандзависимого управления служат способы регуляции:

Вместе с тем, некоторые сигнальные молекулы, например стероидные гормоны, тироксин и оксид азота, растворяются в липидах и поэтому поступают прямо в клетку через липидный бислой мембраны, где связываются с внутренними рецепторами. Такая внутренняя регуляция получила название рецептор-опосредованной сигнализации (рис. 38). В частности, если сигнальными молекулами являются стероиды, то они связываются в цитоплазме с лигандами и в комплексе с ними движутся в клеточное ядро.

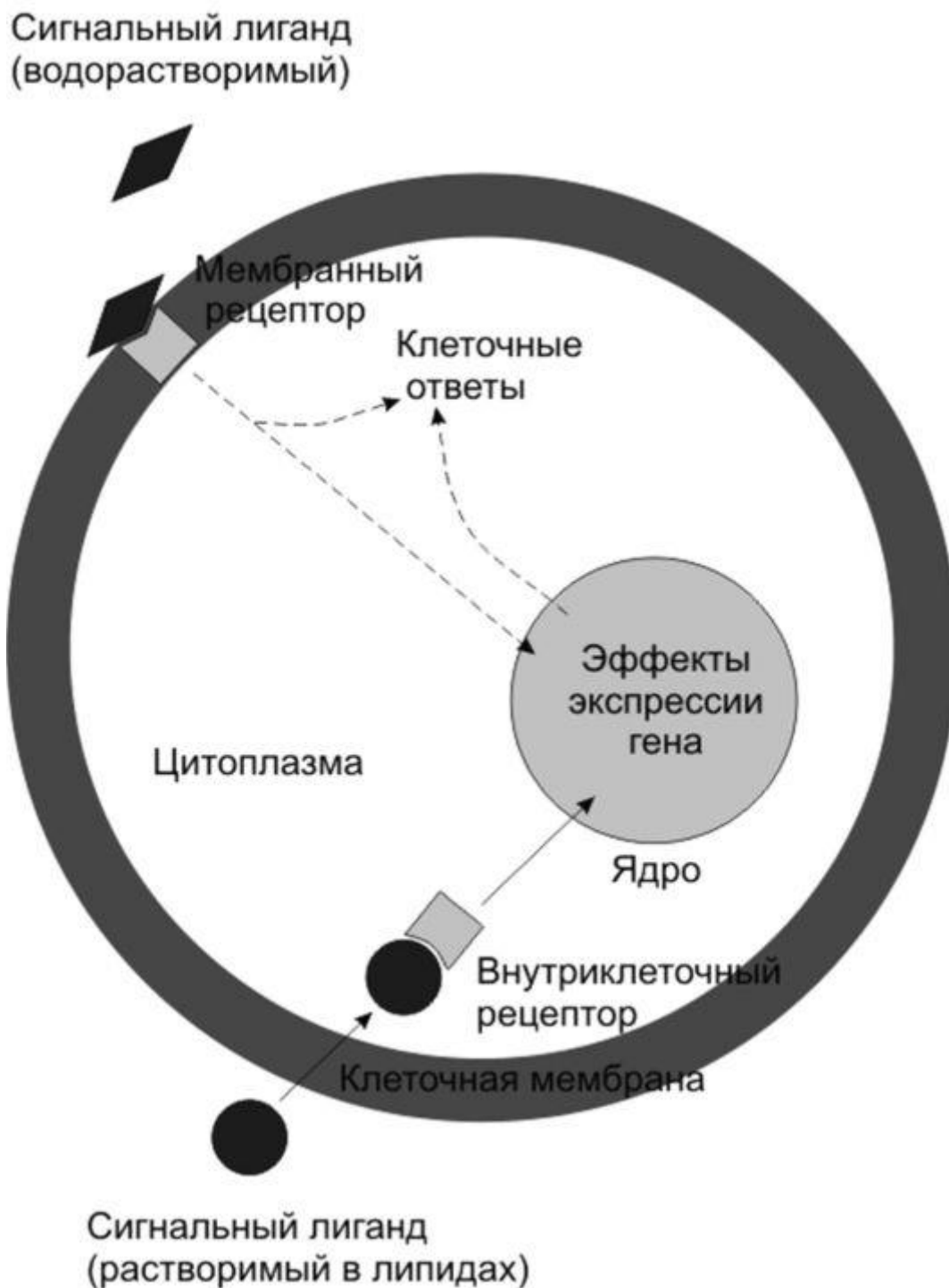


Рис.

38. Основные события при внутренней рецептор-опосредованной сигнализации (по Эллиот В., Эллиот Д., 2002)

Если лигандом является оксид азота, то внутриклеточный рецептор вырабатывает циклический GMP, оказывающий прямое метаболическое действие.

Завершая рассмотрение основных путей и механизмов управления метаболизмом, следует подчеркнуть, что все они часто контролируют одни и те же ферментативные реакции. Безусловно, что такой контроль происходит в соответствии с программой онтогенеза, которая определяет, какой путь управления и когда следует применить на уровне клетки и организма (см. главы 12 и 13). Вместе с тем, на вопрос, как она это делает, ответить пока нельзя.

Более того, возникает новый вопрос: как рассмотренные пути и механизмы используются в конкретных условиях регуляции метаболизма в отдельной клетке и организме в целом? Ответа нет.

Например, если внешняя регуляция путем фосфорилирования - дефосфорилирования зависит от активности фермента-мишени, которая определяется внешним сигналом, то внутренняя аллостерическая регуляция осуществляется при совместном участии фермента и субстрата.

Следовательно, в этой проблеме существует много вопросов, на которые почти нет ответов.

Другие ранее известные способы внешнего и внутреннего управления метаболизмом

Кроме механизма открытия лигандзависимых ионных каналов, сигнальные молекулы могут передаваться в клетку (к ее ядерным и цитоплазматическим структурам) непосредственно от соседних клеток. Выделены два таких механизма: непосредственная передача сигнала при активации Т-хелперной клетки антигенпредставляющей клеткой (см. главу 15); передача сигнала через регуляторные поры или щелевые контакты между соседними клетками, когда АТР и сигнальные молекулы переходят из клетки в клетку благодаря прямому взаимодействию между их цитоплазмами (см. главу 6).

Способы и примеры управления метаболизмом, описанные в последние годы

Поступающие к клеткам внешние сигналы регулируют внутриклеточную активность двумя способами управления метаболизмом: не затрагивая и затрагивая экспрессию генов.

Примерами регуляции без затрагивания экспрессии генов являются:

- активация ацетилхолином произвольных мышечных сокращений;
- открытие лигандзависимых пор в мембранах нейронов при включении нервного импульса;
- регуляция активности ферментов, участвующих в метаболизме жиров и углеводов.

Имеются также многочисленные примеры регуляции с затрагиванием экспрессии генов, так как от нее зависят практически все внутриклеточные генетические процессы.

ДНК-связывающие факторы

В регуляции клеточной активности с затрагиванием экспрессии генов участвуют ДНК-связывающие факторы, работающие преимущественно на уровне транскрипции мРНК. К ним относятся молекулы РНК-полимеразы I (для рРНК), II (для мРНК) и III (для тРНК) и многочисленные факторы транскрипции. Они участвуют в генной экспрессии на протяжении всего онтогенеза, включая процессы дифференцировки клеток и тканей.

В последние годы были идентифицированы гомеотические гены, или гены, ответственные за эмбриональное развитие (см. главу 12). Продукты их экспрессии - пептиды имеют сходные домены или гомеодомены, а участки ДНК, кодирующие такие гомеодомены, называются гомеобоксами.

Большинство гомеодоменов - это ДНК-связывающие факторы. Они представляют собой пептиды длиной не более 60 аминокислотных остатков. Гомеодомены сгруппированы в семейства, среди которых выделены «белки с мотивами».

«Мотив» - это узнаваемое структурное свойство или небольшой участок молекулы белка, связывающийся с операторным участком гена. Выделены три типа «мотивов».

Первый тип мотива: «спираль-поворот-спираль», или НТН-белки (рис. 39). Такая молекула включает две альфа-спирали, соединенные бета-изгибом. Из них одна узнающая спираль располагается в большой бороздке молекулы ДНК.

При этом ДНК-узнающий участок мотива этого типа является неполным палиндромом (палиндром - это фраза, одинаково читаемая слева-направо и справа-налево, например: «ум его - бог ему»). Две половины палиндрома действуют как единое целое.

И хотя палиндром не абсолютен, обе его половины представляют собой участки идентичного связывания нуклеотидных последова-

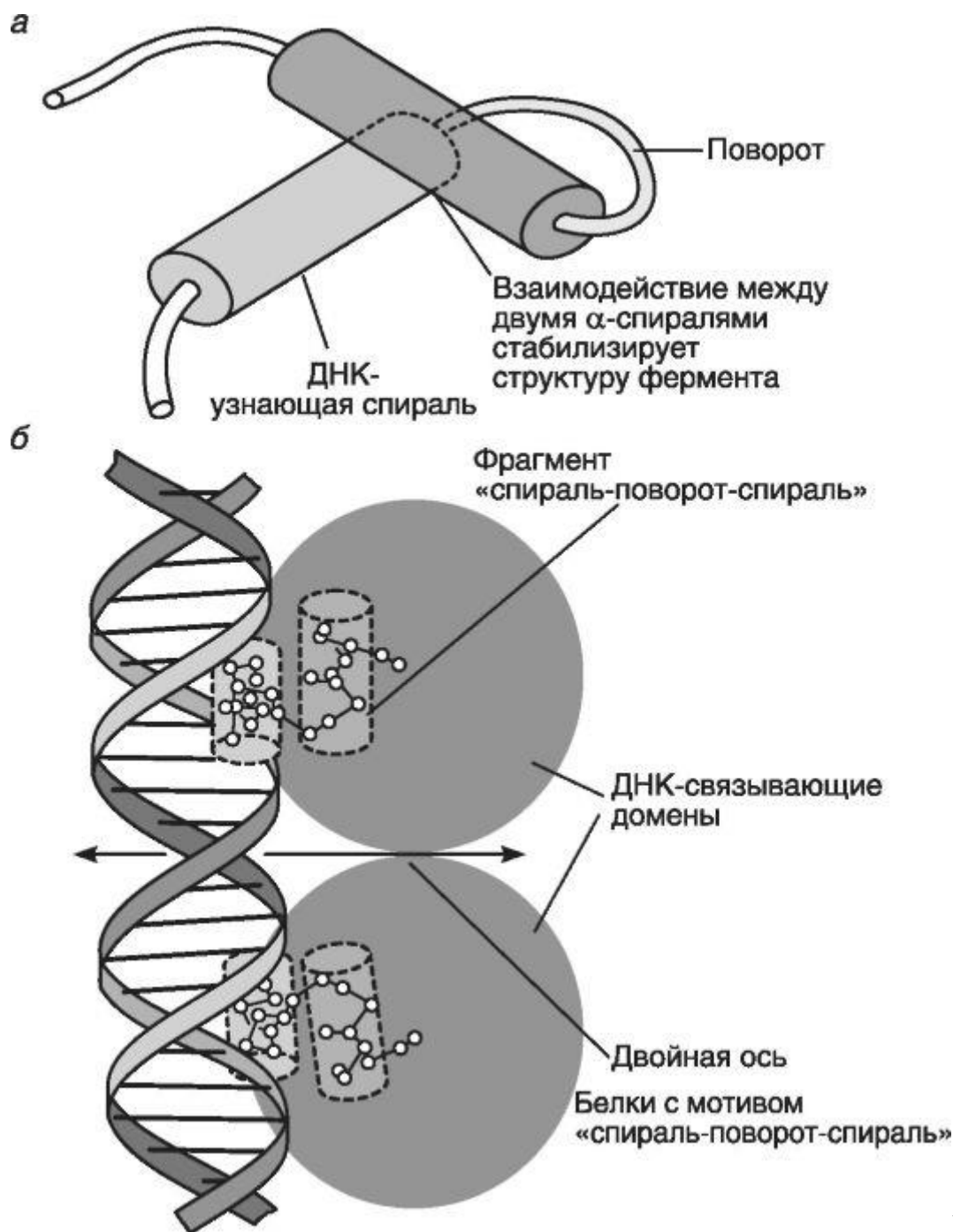


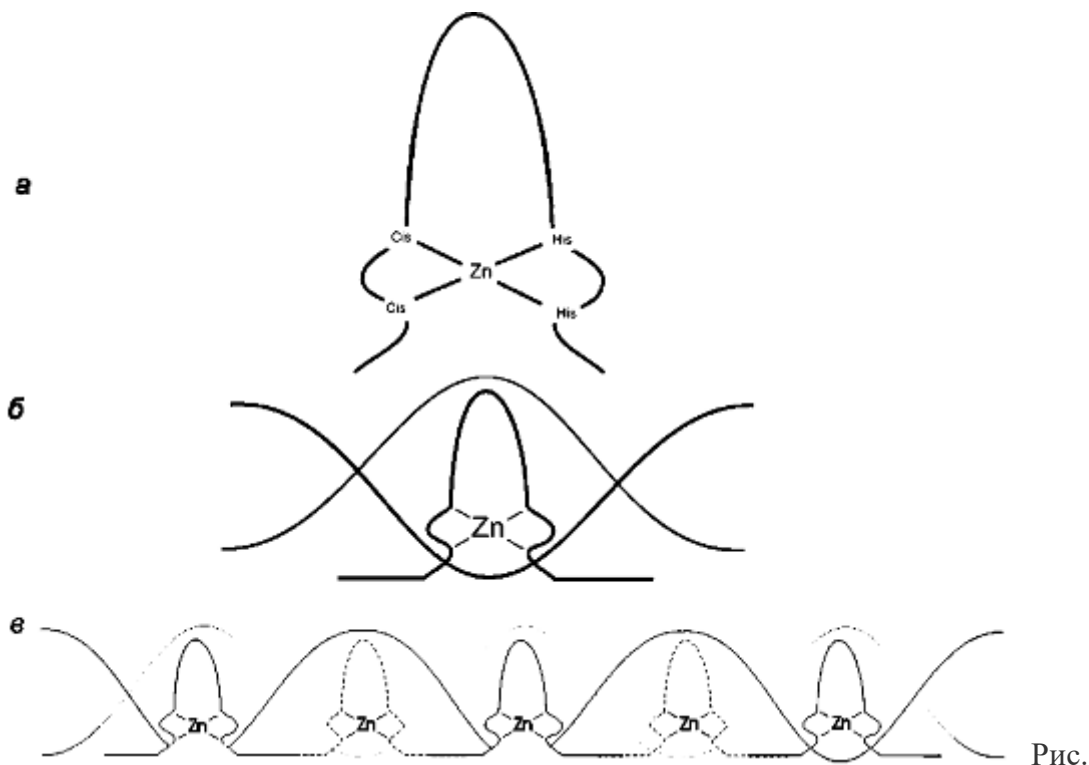
Рис.

Д., 2002)

тельностью ДНК. Примерами служат белки-гомомодимеры, состоящие из двух одинаковых субъединиц (узнающие спирали), которые подходят к нуклеотидам.

Второй тип мотива: «цинковые пальцы» (рис. 40). Молекула такого белка включает один атом цинка, два остатка гистидина и два остатка цистеина, например, в составе рецепторов для стероидных гормонов. Другой пример - это мутация в гене GLI3 (7p15.1), которая обуславливает развитие краниосиндактилии Грейга или цефалополисиндактилии.

Третий тип мотива: «лейциновая молния», или гомеодоменные белки со структурой, напоминающей «застежку-молнию» (рис. 41). В молекуле белка с таким мотивом каждая седьмая аминокислота представлена лейцином, остатки которого появляются на одной сто-



40. Белки с мотивом «цинковые пальцы» (по Эллиот В., Эллиот Д., 2002): а - структура «цинкового пальца»; б - модель взаимодействия между областью мишени в ДНК и белком, содержащим «цинковый палец». Одна сторона структуры «пальца» представляет собой спираль, она прикрепляется к большой бороздке ДНК;

в - множество фрагментов типа «цинковых пальцев», связанных с ДНК

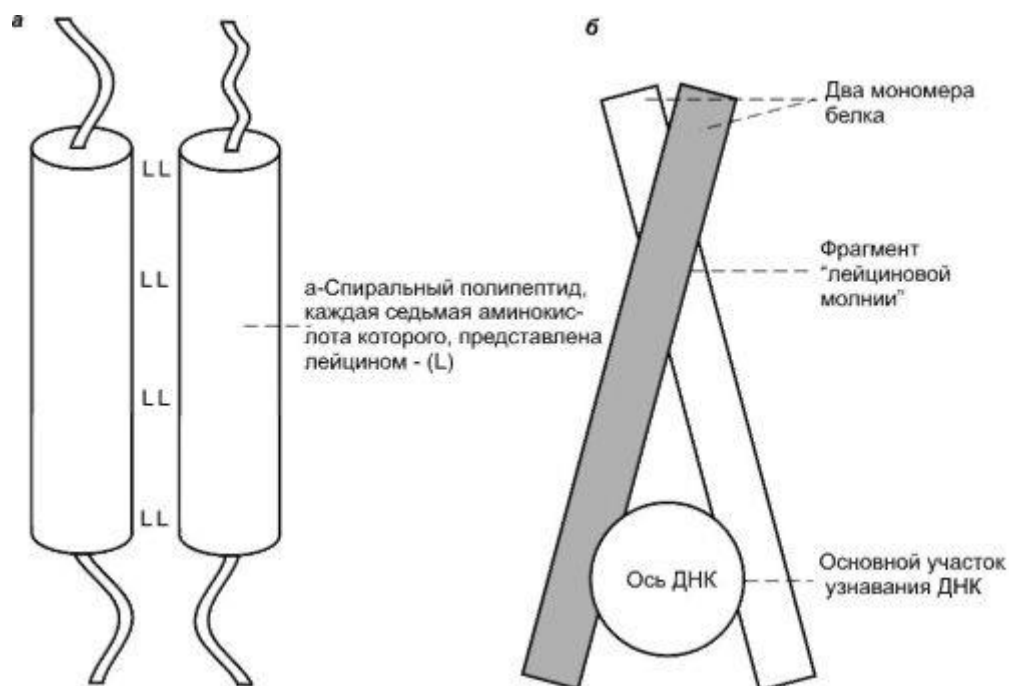


Рис.

41. Белки с мотивом «лейциновая молния» (по Эллиот В., Эллиот Д., 2002): а - строение фрагмента «лейциновой молнии». Гидрофобные остатки лейцина располагаются друг против друга, но не переплетаются, подобно зубцам на молнии; б - прикрепление к ДНК белка, содержащего «лейциновую молнию» (вниз по оси ДНК)

роне альфа-спирали, формируя гидрофобную поверхность. Две такие поверхности соединяются за счет взаимодействия между боковыми цепями лейцинов.

Особенности путей передачи внутриклеточных и межклеточных сигналов

В настоящее время известны как минимум 17 путей передачи внутриклеточных и межклеточных сигналов и два пути передачи сигнала на клетку при стрессовых воздействиях.

Все эти сигналы передаются с помощью сигнальных молекул: гормонов, нейромедиаторов, факторов роста, факторов некроза опухолей, цитокинов и других посредников, а также через каскадные реакции, регулирующие в ответ на внешние воздействия клеточные эффекты: дифференцировку, пролиферацию, апоптоз и некроз (см. главу 11).

Для передачи любого рода сигналов в клетке и организме важны две особенности.

Первая особенность - это реакции «белок-белок», формирующие широкие сети межмолекулярных связей, отличающихся высокой сте-

пенью сложности (как и метаболические пути). Например, основной путь внутриклеточной сигнализации - RAS-путь - связан с другими регуляторными путями во многих перекрывающихся точках (см. ниже), т.е. речь идет об интерференции регуляторных механизмов.

Вторая особенность состоит в том, что разные ферменты одного и того же пути передачи сигнала могут иметь разные белки-мишени, т.е. существует возможность активации альтернативных путей и регуляторных каскадов. Например, Ras-белок (участник основного RAS-пути) может фосфорилироваться и активироваться протеинкиназой А (ПК А) только тогда, когда она будет активирована в фосфоинозитидном пути.

В свою очередь, в ходе этого пути способен активироваться внутриклеточный рецептор (но уже другим ферментом - тирозинкиназой), который может соединиться с SH₂-белками других путей передачи сигналов, т.е. один тип рецептора в состоянии вызвать активацию разных сигнальных путей.

Прежде чем дать характеристику основных сигнальных молекул клетки и организма, дополнительно рассмотрим еще несколько наиболее изученных путей передачи внутриклеточных сигналов и их особенности.

Изменение активности протеинкиназы под действием сАМР

Циклический нуклеотид АМР (сАМР) образуется из АТР с помощью аденилатциклазы, локализованной на внешней стороне плазматической мембраны. Этот нуклеотид часто используется гормонами как вторичный мессенджер, тогда как сами гормоны являются первичными посредниками в регулируемых ими реакциях, например, адренокортикотропный и антидиуретический гормоны, гонадотропины, глюкагон, катехоламины (адреналин и норадреналин), соматостатин, тиреостимулирующий и паратиреоидный гормоны.

Известны два направления сАМР-опосредованного пути изменения активности протеинкиназы под действием этого нуклеотида:

- контроль уровня сАМР;
- контроль действия сАМР на транскрипцию гена.

В ходе *первого направления* происходит активация аденилатциклазы адреналином, и в результате в клетках печени и скелетных мышц образуется сАМР. Посредником здесь служит гетеромерный G-белок, у которого на альфа-субъединице расположен участок, связывающий либо GDP (тогда ничего не происходит), либо GTP (тогда следует реакция). Иными словами, G-белок перемещается от рецептора к

аденилатциклазе и обратно, являясь своеобразным «переключателем».

Важность этого события можно продемонстрировать на примере гидролиза GTP, происходящего при действии токсина, вырабатываемого холерным вибрионом. Этот токсин необратимо ингибирует GTP- активность G-белка, что не позволяет выключить «переключатель», и поэтому продолжающееся образование сАМР приводит к массивной потере клетками ионов Na⁺, их дегидратации (в результате изнуряющей организм диареи) и смерти больного от потери жидкости и электролитов.

В ходе *второго направления* сАМР активирует ПК А, участвующую в механизме регуляции клеточной активности с затрагиванием генной экспрессии. Когда ПК А фосфорилирует CREB-белок, то последний становится активным фактором транскрипции по типу мотива «лейциновая молния» (см. выше).

Следует выделить еще один путь сигнализации с использованием уже другого циклического нуклеотида - сGMP, увеличение уровня которого активирует протеинкиназу G (ПК G). В этом случае образование сGMP из GTP катализирует образование мембраносвязанной и растворимой форм гуанилатциклазы.

Первая форма представлена внутриклеточным доменом рецепторного белка (он опосредует клеточный ответ, активируя ПК G по ходу катализа сGMP). Примером этого пути служит ?+-уретический фактор предсердий, вырабатываемый в эндотелиальных клетках. Этот фактор стимулирует выделение почками натрия.

Эффекты cGMP отмечаются также при расслаблении гладких мышечных волокон, работе нейронов и реализации функции зрения.

Вторая форма гуанилатциклазы включает в качестве простетической группы молекулу гема, с которой связывается оксид азота, образуемый в эндотелии сосудов из гуанидиновой группы аргинина под действием нитроксидсинтазы. Оксид азота диффундирует в мышечные волокна кровеносных сосудов, вызывая образование cGMP и расслабление тонуса сосудов. Процесс образования оксида азота опосредуется нервной регуляцией (стимулируется ацетилхолином) и происходит в ответ на механическое воздействие на стенки сосудов, оказываемое током крови, что ведет к вазодилатации. Именно на этом механизме основано действие тринитроглицерина при лечении приступов стенокардии.

RAS-путь

RAS-путь - это наиболее распространенный путь внутриклеточной сигнализации (от мембраны к гену) или путь к белковым факторам транскрипции с участием тирозинкиназы, которая ассоциирована с рецепторами факторов роста.

Особенностями RAS-пути являются: отсутствие низкомолекулярных вторичных посредников; все компоненты этого пути принадлежат к белкам.

Все клетки имеют Ras-белок или небольшой мономерный GTP- связывающий белок, а также белок, связывающий рецептор фактора роста (GRB), который взаимодействует с фосфорилированным рецептором при участии SH₂-домена (см. выше).

В свою очередь, GRB соединен с SOS-белком, и их комплекс (GRB-SOS) контактирует с активированным рецептором, что вызывает в Ras-белке обмен GDP на GTP. Этот обмен напоминает активацию G-белка при образовании cAMP и обусловлен тем, что Ras- белок обладает низкой GTPазной активностью, позволяющей ему выполнять функцию молекулярного «хронометражного прибора» (рис. 42).

Следующим компонентом RAS-пути является Raf-белок или протеинкиназа серин-треонинового типа, для активации которой необходимо соединение Ras-белка с GTP.

Именно с активации протеинкиназы серин-треонинового типа начинается каскад реакций, завершающихся фосфорилированием белковых факторов транскрипции.



Рис.

42. Активация Ras-белка (по Эллиот В., Эллиот Д., 2002)

Считается, что мутации Ras- и Raf-белков онкогенны, так как приводят к неконтролируемому клеточному делению (новые копии этих белков постоянно находятся в активированном состоянии).

Прямой путь внутриклеточной сигнализации

С рассмотренным выше RAS-путем резко контрастирует относительно простой прямой путь сигнализации от рецептора к ядру клетки с помощью гамма-интерферона (белок, секретируемый клеткой, инфицированной вирусом). Эта активация способствует присоединению такого белка к чувствительным интерферон-стимулируемым рецепторам или JSRE-элементам, что обеспечивает транскрипцию гена STAT (рис. 43).

Характеристика сигнальных молекул

Сигнальные молекулы - это различные химические соединения: адреналин, ацетилхолин, вазопрессин, глюкагон, дофамин, инсулин, норадреналин, тироксин, оксид азота, эйкозаноиды (простагландин, тромбоксан, лейкотриены лейкоцитов), а также стероиды (глюкокортикоиды, прогестерон и эстроген). Среди них выделяют полярные и неполярные соединения.

Первые соединения не проникают внутрь клетки, но связываются с находящимися на ее поверхности рецепторами, которые передают клетке сигнал, инициируя цепь последовательных реакций (каскадов).

Вторые соединения (например, стероидные гормоны) легко проникают в клетку, диффундируя через липидный бислой.

Сигнальные молекулы разделены на многочисленные группы: гормоны, рафты, регуляторные факторы развития, цитокины, интерлейкины, нейромедиаторы, факторы некроза опухолей и т.д.

Рассмотрим основные из них.

Гормоны

Гормоны - это классические сигнальные молекулы. В обобщенном виде действие гормона можно представить как действие первичного месседжера, который связывается с рецепторами клетки-мишени и через них передает сигнал.

В ряде случаев, например, при действии глюкагона, адреналина или норадреналина, может проявиться уровень вторичного месседжера - молекулы, запускающей внутри клетки те или иные метаболические реакции в ответ на связывание первичного месседжера.

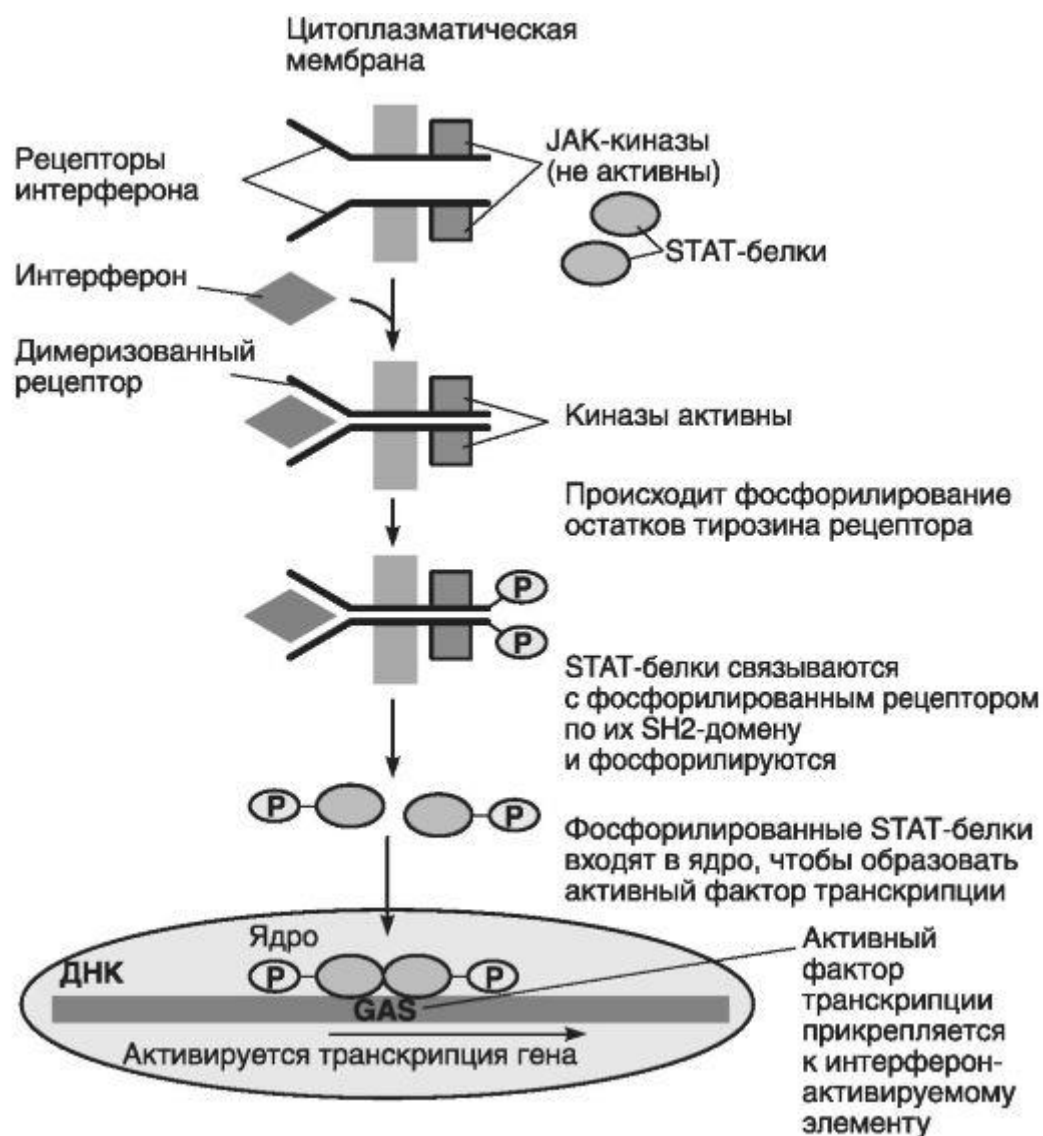


Рис.

43. Сигнальный путь с участием гамма-интерферона (по Эллиот В., Эллиот Д., 2002):

JAK - киназы или цитоплазматические тирозинкиназы; STAT - белки или передатчики сигналов и активаторы транскрипции; GAS - активируемый гамма-интерфероном; JSRE - элемент в нуклеотидной последовательности

гена

В роли вторичного мессенджера обычно выступает cAMP, синтезируемый ацетилатциклазой из АТР (см. выше). При этом циклический АМР аллостерически активирует протеинкиназу, которая в свою очередь активирует киназу фосфорилазы, а та с помощью протеинфосфатазы I активирует фосфорилазу из неактивной формы b в активную форму a.

Иногда при передаче клетке сигнала извне происходит событие, получившее название «управление числом рецепторов» (см. главу 25). Оно связано с длительным контактом гормона с рецепторами клетки, что обуславливает обратимое снижение числа рецепторов, и слабый ответ клетки на сигнал - это так называемая даунрегуляция. Кроме того, рецепторы клетки могут быть инактивированы в результате фосфорилирования цитоплазматической киназой.

Рафты

Рафты или кавеолы играют важную роль в передаче клеточных сигналов через мембраны. Рафты находятся с обеих сторон мембраны и стабилизируются в присутствии мембранных белков, определяющих их структуру. Основой для их образования служат трансбислойная и латеральная асимметрия липидов, разная упаковка жирнокислотных цепей, обеспечивающая смешиваемость.

Это плотные маленькие частицы около 50-70 нм в диаметре, связывающие множество молекул гликофосфоинозитидов у GPI- заякоренных белков. Размеры этих частиц зависят от концентрации липидов в клетке и внешних условий, что создает непрерывность рафтовых модификаций.

Особый тип рафтов - это пещеры (малые карманы), являющиеся структурами клеточной поверхности, активно участвующими в следующих реакциях.

- Образование эндо- и экзоцитозных компартментов на поверхности мембран, способных импортировать молекулы внутрь клетки или экспортировать их во внеклеточное пространство, что имеет огромное значение для сигнализации. Например, это малые карманы адипоцитов, фибробластов, всех типов мышечных клеток, клеток эндотелия капилляров, пневмоцитов I типа.
- Трансцитоз, разложение (интернализация) токсинов, бактерий и вирусов, транспорт холестерина, гомеостаз Ca^{2+} , сортировка мембранных белков, трансдукция клеточных сигналов, генерация и конверсия патогенных форм прионных белков, включая развитие болезни Альцгеймера (см. главу 28). Рафты - пещеры - пред-

ставляют собой липидорганизованные микродомены или своеобразные мембранные «машины», сортирующие молекулы. Они способны координировать пространственно-временную организацию путей передачи сигналов внутри определенных областей мембраны, называемых сигналосомами. Последние содержат специфические пептиды: кавеолины 1-3, флотиллины 1-2, ганглиозиды GM1-GM3, а также GPI-заякоренные белки - все они латерально диффундируют внутри мембраны (подобны «челноку»). Именно рафты-сигналосомы предназначены для процессов трансдукции сигналов, выполнения транспортных функций по везикулярной интерканализации микромолекул и межклеточному движению макромолекул (трансцитоз). Они участвуют в клеточной адгезии и связывании антигенов рецепторами В-клеток. В настоящее время получены убедительные доказательства в пользу существования рафтов, способных быстро собрать (кластеризировать) высокоупорядоченный сигнальный комплекс и обеспечить перекрещивание между собой нескольких одновременно протекающих сигнальных путей, включающих как задержку, так и усиление их взаимодействия с индивидуальными белками клетки.

Показано, что рафты участвуют в передаче сигналов рецепторами с помощью:

- связывающих G-белков;
- эпидермального фактора роста (EGFR);
- различных GPI-заякоренных белков;
- белков, реагирующих на инсулин и фактор роста фибробластов-2 (FGF).

Показано также, что рафты могут быть использованы различными патогенами для их проникновения в клетку, включая бактерии (и их токсины), вирусы и микроорганизмы.

Кроме того, в процесс проникновения патогенов могут быть вовлечены GPI-заякоренные белки типа CD48, ганглиозид GM1 и гликолипид Gb3, используемые в качестве рецепторов, и микобактерии с холестерином. Большой интерес представляет взаимодействие нейротоксинов столбняка и ботулизма с ди- и трисиалоганглиозидами (Gd1a, GD1, GT1b) на поверхности пресинаптических мембран нейронов. Для объяснения этого механизма С. Montecucco (1986) предложил модель «двойного рецептора».

Согласно этой модели, рафты обеспечивают «окружение» патогенов и токсинов большим количеством низкоаффинных рецепто-

ров, стабилизирующих их «захват» на поверхности клетки, и затем перемещают патогены и токсины к высокоаффинным рецепторам. При этом специфические липиды в рафтах могут действовать как белки - молекулярные шапероны, инициируя конформационные изменения в структуре белков патогенов и токсинов, перемещенных к высокоаффинным рецепторам.

Кроме того, данная модель соответствует реакции слияния, наблюдаемой в ходе инфицирования клеток человека вирусом иммунодефицита.

Цитокины

Цитокины - это вещества белковой природы, секретируемые клетками, вступившими в кооперативные отношения, что необходимо для полноценного созревания эффекторных и регуляторных клеток.

В ходе кооперативных отношений цитокины связываются с рецепторами на клеточных мембранах, вызывая каскадные реакции, индуцирующие (усиливающие или подавляющие) активность регулируемых ими генов.

Первоначально понятие «цитокин» использовалось иммунологами для обозначения молекулярных факторов взаимодействия, участвующих в иммунном ответе (см. главу 15). В дальнейшем его стали использовать для характеристики рецепторов, действия гормонов, проведения нервного импульса и других целей.

Цитокины - это кратковременно живущие и жестко регулируемые факторы, представляющие собой небольшие белки (8-80 кДа), действующие аутокринно или паракринно.

У человека выделено более 100 разновидностей цитокинов и постоянно выявляются новые.

К цитокинам относятся: факторы роста, интерлейкины (их известно не менее 18), интерфероны (не менее 15), факторы некроза опухолей (ФНО), колониестимулирующие факторы, хемокины или хемотаксические цитокины (их более 50).

Цитокины редко образуются по отдельности и редко действуют в одиночку. Между ними имеется небольшое сходство на уровне контролирующих их экспрессию нуклеотидных последовательностей ДНК и аминокислотных последовательностей в них самих.

По гомологии функционирования среди цитокинов выделяют три семейства.

К *первому семейству* цитокинов (по сходству первичной и третичной структуры) относится большинство цитокиновых рецепторов, являющихся гликопротеинами, состоящими из единственного трансмембранного домена (см. главу 6). Среди них выделяют наиболее известные цитокины - рецепторы: к интерлейкинам (ИЛ 2-7, ИЛ 9-12), гранулоцитарному колониестимулирующему фактору (Г-КСФ) и гранулоцитарному

макрофагальному колониестимулирующему фактору (ГМ-КСФ), включая рецепторы к СТГ и пролактину.

Ко *второму семейству* относятся иммуноглобулинподобные рецепторы ко всем интерлейкинам и отдельно к ИЛ 1-альфа, ИЛ 1-бета и

М-КСФ.

Третье семейство - это рецепторы, связывающие ФНО-альфа и ФНО-бета, лимфотоксин, фактор роста нервов и FAS или CD95 (его связывание с лигандом FASL служит сигналом клеточной гибели нейронов).

Регуляторные факторы роста

Регуляторные факторы роста (или развития - их так называли раньше) - это регуляторные белки, выделяемые клетками той же ткани, к которой они принадлежат, например гепатоцитами и лимфоцитами. Большинство факторов роста диффундируют на короткие расстояния и поэтому действуют на близлежащие клетки - это *паракринный эффект*.

Выделен также местный *аутокринный эффект* (на клетку, которая продуцирует эти факторы), например, интерлейкин-2 стимулирует пролиферацию Т-клеток.

Регуляторные факторы роста взаимодействуют с наружными рецепторами клеток-мишеней и тем самым влияют на инициацию транскрипции тканеспецифических генов.

При определенных условиях один и тот же регуляторный фактор роста может выступать как стимулятор или, наоборот, как ингибитор клеточной дифференцировки. Среди регуляторных факторов роста выделены: EGF - фактор роста эпидермиса; PDGF - фактор роста тромбоцитов (образуется не только в них, но и в других клетках); интерлейкины или колониестимулирующие факторы (регулируют развитие лейкоцитов); факторы гемопоэза в костном мозге (их около 20).

Интерлейкины

Интерлейкины выполняют роль нейротрансмиттеров или переносчиков сигнальной информации, регулирующей метаболические,

трофические, иммунные и другие процессы в нейронах. Они также принимают участие в апоптозе нейронов (см. главы 11 и 13).

Факторы некроза опухолей

Наряду с интерлейкинами в апоптозе нейронов принимают участие ФНО. Это медиаторы эндотоксического шока, вызывающие блокаду русла терминальных сосудов с последующим некрозом ткани мозга.

ФНО - это еще и иммунологические модуляторы, вызывающие иммунные реакции в других тканях и органах путем прямого или опосредованного действия через цитокины. ФНО также называют медиаторами взаимосвязи нервной и иммунной систем или посредниками между ЦНС и периферической иммунной системой. Например, в случае некротического энтероколита при воздействии эндотоксина кишечной палочки, продуцирующего ФНО, развивается повреждение перивентрикулярной области (ПВО) мозга (см. главу 13). При этом повреждении ишемия ПВО развивается за счет гипотензивного эффекта и усиления коагуляции с образованием очагов сосудистой деструкции, а также за счет стимуляции продукции фактора активации тромбоцитов - этот процесс называется *вазоконстрикцией*.

ФНО способствуют деструкции олигодендроглиоцитов и пролиферации астроцитов, вызывая иммунные сдвиги в мозге и дисмиелинизацию нервных волокон белого вещества ПВО.

Во внутриутробном онтогенезе ФНО стимулируют продукцию простагландинов, что может вызвать преждевременные роды и способствует низкому гестационному возрасту, т.е. проявляется как фактор риска перивентрикулярной лейкомаляции и других поражений ПВО.

По-видимому, интерлейкины, нейромедиаторы и ФНО преимущественно функционируют как факторы роста, участвующие в формообразовании мозговых структур (как составная часть ПВО).

Интерфероны

Как было сказано выше, сигнализация с помощью интерферонов - это прямой путь передачи информации от рецептора к ядру. В 1957 г. было установлено, что инфицированные вирусом клетки секретируют белки-интерфероны, которые их защищают от тех же или других вирусов.

На клетках имеются интерферон-стимулирующие чувствительные элементы или JSRE-рецепторы, при присоединении к которым

интерфероны вызывают специфический ответ генов клетки, усиливающий их экспрессию. Рецептор гамма-интерферона связывается с двумя молекулами цитоплазматической тирозинкиназы (JAK- киназы). Связывание лиганда вызывает димеризацию рецептора, что ведет к активации тирозинкиназы, и в результате фосфорилируются остатки тирозина рецепторного димера. Это, в свою очередь, ведет к связыванию двух цитозольных белков с фосфорилированным рецептором, которые имеют SH₂-домены. Такие же домены есть у GRB- белка в ходе RAS-пути (см. выше).

После фосфорилирования SH₂-доменов последние превращаются в фосфорилированные STAT-белки, которые движутся в клеточное ядро, где собираются в активный фактор транскрипции, который прикрепляется к интерферон-активированному элементу, что способствует транскрипции JSRE-элементов (см. рис. 43).

Нейромедиаторы

Нейромедиаторы - это небольшие заряженные молекулы, которые выделяются пресинаптическими мембранами и связываются с рецепторами постсинаптических мембран. Они участвуют в процессах умственной деятельности и обеспечивают работу нейронов, иннервирующих ткани и органы (см. главу 13).

Как известно, основой умственной деятельности является межнейронная связь, а пусковым сигналом служит нервный импульс. В нервных окончаниях (аксонах нейронов) в ходе сложных биохимических превращений производится специфический медиатор, который поступает к постсинаптической мембране, где соединяется с молекулой соответствующего ему рецептора. В результате в нейронемиишени рождается новый нервный импульс, и так происходит по всей цепочке межнейронных связей.

Биохимический тип синапса определяет сродство молекул медиатора, выделяемого в синапс, и специфического к нему рецептора, принимающего медиатор на постсинаптической мембране.

Характеристика эргических систем

Нейроны, способные выделять (кринировать) в синаптическую щель один и тот же медиатор, так же как и нейроны, имеющие мембранные рецепторы к данному нейромедиатору, объединяются в эргические системы. Наиболее изученными из них считаются: дофаминэргическая, норадреналинэргическая, ацетилхолин-эргическая и серотонинэргическая системы. Как правило, нейроны, форми-

рующие эти системы, связаны между собой особыми нервными путями - эргическими трактами. Это аксональные и дендритные отростки, соединенные эргическими синапсами.

В случае любых эргических систем всегда существует одно направление прохождения сигнала: от пресинаптической мембраны к постсинаптической.

На рис. 44 приведена схема работы синапса норадреналинэргической системы.

Как следует из этой схемы, межмолекулярные взаимодействия при распространении нервного импульса через норадреналинэргический синапс включают ряд звеньев.

Первое звено - терминальное окончание аксона. Нервный импульс активирует ионы Ca^{2+} , инициирующие продвижение синаптических пузырьков к пресинаптической мембране, в которую включаются эти пузырьки. Здесь поступивший из крови тирозин превращается в присутствии тирозингидроксилазы в дезоксифенилаланин (ДОФА), который (в присутствии дофамин- β -гидроксилазы) превращается в норадреналин или тирозин-Дофанорадреналин.

Второе звено - синаптическая щель, Сюда из пресинаптической мембраны выходят синаптические пузырьки и разрываются в ней с выделением (кринированием) нейромедиатора. Условно разделим весь объем выделившегося медиатора на четыре порции.

Первая порция поступает в постсинаптическую мембрану клеткамишени.

Вторая порция обратно поглощается (пиноцируется) пресинаптической мембраной, где утилизируется с образованием синаптических пузырьков.

Третья порция под влиянием катехол-О-метилтрансферазы инактивируется и распадается на конечные продукты. Четвертая порция возвращается к пресинаптической мембране, но не превращается в синаптические пузырьки, а служит сигналом к торможению образования новых порций норадреналина из его предшественников.

Третье звено - постсинаптическая мембрана. Здесь происходит соединение первой порции медиатора с белками мембраны. В результате запускаются молекулярные реакции двух направлений.

Первое направление - половина первой порции медиатора фосфорилирует мембранные белки (из АТФ в присутствии аденилатциклазы образуется сАМФ, из которого в присутствии фосфодиэстеразы образуется АМФ, и далее в присутствии АМФ идет фосфорилирование).

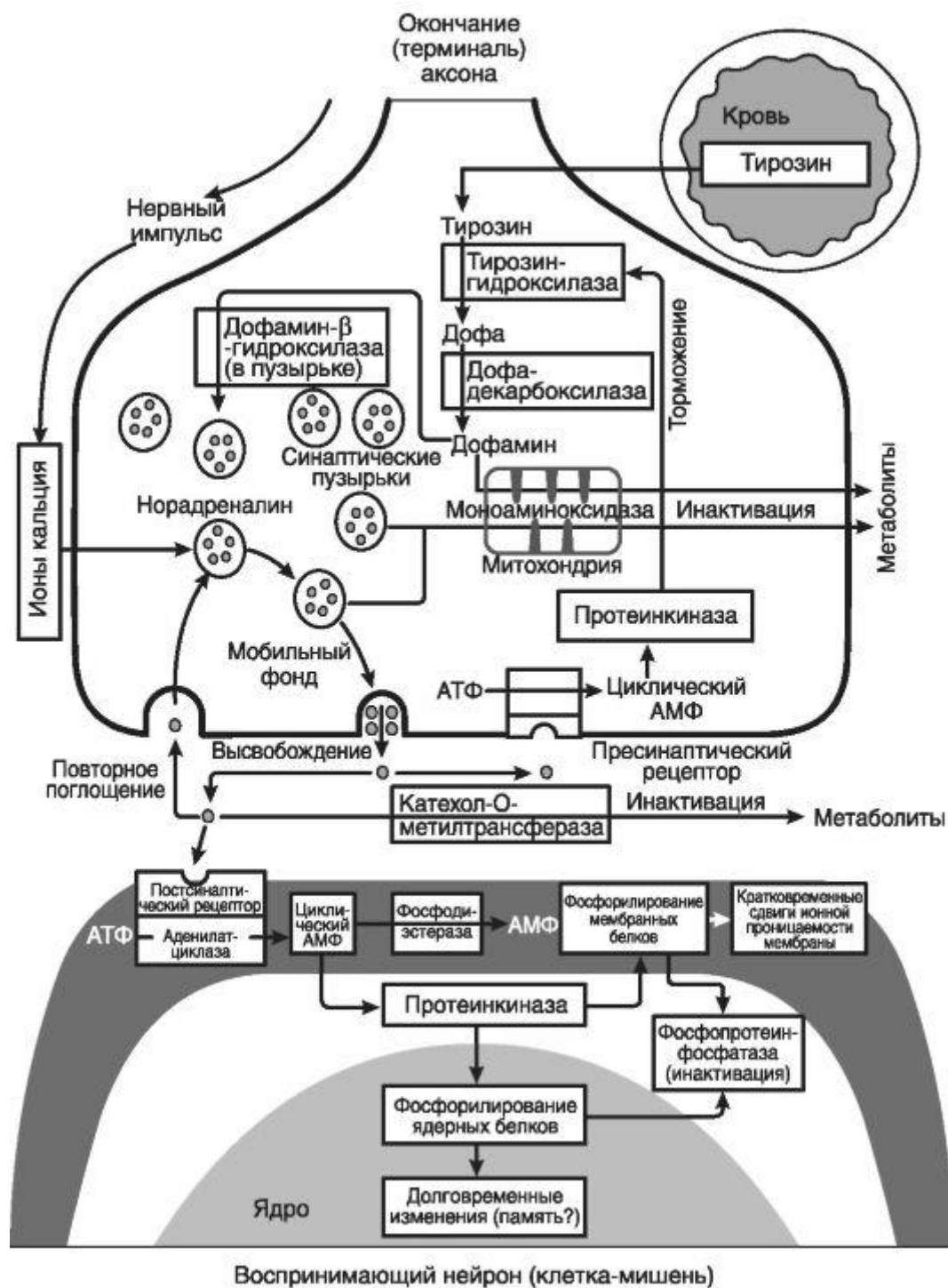


Рис.

44. Схема работы синапса норадреналинергической системы (по Скворцову И.А., 2000)

Второе - вторая половина первой порции медиатора фосфорилирует с помощью протеинкиназы мембранные белки, а с помощью протеинфосфатазы - ядерные белки, что обуславливает развитие долговременной «памяти» нейрона о произошедших молекулярных событиях.

Четвертое звено - это также постсинаптическая мембрана. В ней в результате фосфорилирования мембранных белков происходят кратковременные сдвиги ионной проницаемости, благодаря которым запускается процесс деполяризации мембраны и рождается новый импульс, распространяющийся к другой клетке-мишени в виде очага нервного возбуждения.

Следовательно, любую эргическую систему определяют связи между различными образованиями головного и спинного мозга через рецепторы мембран нейронов в этих образованиях. Такие рецепторы способны обеспечить специфическую реакцию на нейромедиатор или другую молекулу-посредник в ходе передачи информации. Их называют нейромодуляторами (нейротрансммиттерами).

Нейромедиаторами являются глутамат, норадреналин и серотонин (синапсы центральной нервной системы), а также ацетилхолин (синапсы периферической нервной системы).

При контактах нейромедиаторов с рецепторами клеток-мишеней в мембранах открываются лигандзависимые ионные каналы, специфичные для ионов Ca^{2+} , и K^{+} (см. выше).

Очевидно, что функционирование эргических систем обеспечивается необходимым количеством энергии в виде АТФ (см. главу 7). Необходимо отметить, что резервным макроэргическим соединением для АТФ является креатинфосфат, который при участии фермента - креатинкиназы приводит к взаимодействию АТФ и креатина, т.е. в ходе креатинкиназной реакции происходит регенерация АТФ за счет использования фосфатных групп молекулы креатинфосфата, обладающих высокой активностью (как, например, метильные группы).

При работе мышечных клеток фосфатная группа молекулы креатинфосфата может обратимо передаваться на АДФ с образованием АТФ, но получаемый при этом креатинин не будет нести никаких функций и выделится с мочой пропорционально мышечной массе тела.

Завершая рассмотрение путей и механизмов управления метаболическими реакциями и сигнализации в клетке и организме, следует заключить, что эволюция не ограничилась созданием только выше-

перечисленных путей и механизмов. Безусловно, их должно быть гораздо больше.

Поэтому и нераскрытых секретов молекулярной жизни клетки и организма должно быть больше, чем это известно в настоящее время. В пользу такой убежденности свидетельствуют, например, следующие факты.

Так, гормоны гипофиза, надпочечников и щитовидной железы воздействуют на метаболизм не всегда понятным образом: их действие обычно опосредовано множеством событий и растянуто во времени.

Другой пример: в клетках мозга и печени поглощение глюкозы не зависит от инсулина, а в мышечных клетках и клетках жировой ткани оно ускоряется инсулином. По-видимому, в этих тканях по-разному происходит ускоренный перевод неактивных транспортных белков в активные белки клеточных мембран, что ведет к изменению равновесия между цитоплазматическим и мембранным уровнем этих белков.

Таких пока еще не до конца изученных путей и механизмов управления ферментативными реакциями довольно много. Сегодня ясно лишь одно: все они контролируются программой онтогенеза. Но как это происходит? Этот вопрос во многих случаях остается без ответа.

ГЛАВА 9 НОРМАЛЬНОЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ, АДАПТАЦИЯ И ПОВРЕЖДЕНИЕ КЛЕТКИ

Параметры нормального функционирования клетки

На основе молекулярного мониторинга были изучены клеточные эффекты в нормальных клетках и клетках с измененными функциями. Показано, что условия нормального (физиологического) функционирования клетки определяют три главных фактора:

- наличие стабильных структурообразующих родительских геномов (отцовская и материнская молекулы ДНК);
- определенный диапазон функциональных характеристик структурообразующих молекул индивида;
- параметры окружающей среды: $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $\text{pH} = 7,35$ (для плазмы крови соответственно $36\text{--}37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $\text{pH}\ 6,5\text{--}7,5$).

Клетка как структурно-функциональная единица организма постоянно зависит от поддержания баланса между ферментными системами, продуцирующими активный кислород (окислительные системы), и антиоксидантными системами. Их соотношение формирует клеточный гомеостаз (и гомеостаз организма в целом), в котором общая сумма антиоксидантов создает «буферную систему», обладающую определенной защитной емкостью против реакций избыточного окисления.

Следовательно, в клетке постоянно поддерживается оптимальное равновесие между реакциями окисления и восстановления. Это равновесие также зависит от дополнительных параметров нормального функционирования. Они следующие:

- стабильная структура ядерных и цитоплазматических компонентов;
- целостность клеточных мембран и ферментных систем, включая восстановительные системы;
- доступность поступающих к клетке метаболитических (энергетических и трофических) субстратов;
- эффективность собственного метаболизма;
- своевременность дифференциации и специализации собственных функций в окружении соседних клеток и др.

Адаптация, повреждение и выживаемость клетки

При воздействии на клетку факторов окружающей среды ею достигается новое устойчивое (приспособленное к ним) временное или стационарное состояние, называемое адаптацией.

В случаях, когда адаптационные возможности клетки ограничены, в ней развивается цепь событий, называемых повреждением, которое до какого-то определенного момента (некий пороговый уровень) может быть обратимым, и клетка сохраняет свою выживаемость (жизнеспособность), зависящую от защитных или восстановительных свойств самой клетки и целого организма.

Иными словами, превышение клеткой допустимого порогового уровня функционирования зависит от эффективности работы как ее защитных (восстановительных) ферментных систем, так и систем целого организма.

Жизненный цикл клетки

В организме два типа клеток: соматические и герминативные (гаметы).

Жизненный цикл соматической клетки или митотический цикл, включает время подготовки клетки к делению (изначально исходная клетка-зигота находится на стадии бластулы) и время, которое занимает непосредственно сам митоз. Такой цикл длится у человека от 12 до 36 ч (в среднем 24 ч) и включает ряд последовательных периодов (фаз).

- G₀-период (фаза покоя) . В связи с тем, что постоянно «покоящихся» клеток не существует вообще, эта фаза считается условной и служит точкой отсчета.
- G₁-период или предсинтетическая фаза , В это время производятся пуриновые и пиримидиновые основания и другие компоненты, необходимые для синтеза ДНК. Продолжительность этого периода занимает 40% времени всего митотического цикла (примерно 10 ч).
- S-период (фаза) синтеза ДНК или репликации (удвоения молекулы). В это время происходит полуконсервативная «сборка» на каждой из двух нитей старой молекулы двух новых молекул ДНК; продолжительность - 39% общего времени цикла (примерно 9 ч).
- G₂-период (постсинтетическая фаза) . В это время синтезируются мономеры белка-тубулина и другие необходимые для митоза компоненты - 19% времени (примерно 4 ч).
- М-митоз, или равномерное разделение клетки (удвоенной молекулы ДНК) на две дочерние клетки - 2% времени (около 1 ч).

Если учесть, что три фазы жизненного цикла (G₁, S и G₂) объединены в интерфазу, то общее время подготовки клетки к митозу составит 23 ч (время интерфазы). К этому времени следует добавить еще 1 ч (время митоза), и, следовательно, общая продолжительность цикла составит 24 ч. Иными словами, в течение 23 ч клетка готовится к делению и в течение одного часа делится.

Именно эта закономерность считается «золотым правилом биологии», согласно которому «работающая (готовящаяся к делению) клетка не делится, делящаяся клетка не работает».

Продолжительность S-периода контролируется теломерами хромосом или «органичителями» репликации ДНК. Эти концевые участки хромосом не несут генетической информации, но зато защищают хромосомы от потерь ДНК в ходе репликации и действия эндонуклеаз. Проблема репликации самих теломер связана с ДНК-полимеразами, осуществляющими синтез ДНК только с использованием РНКпраймеров. Когда праймеры удаляются, то 5'-концы укорачиваются на длину праймера, т.е. на 10-30 нуклеотидов, что должно приводить к потере генов в теломерных участках хромосом.

Теломеры хромосом человека содержат многократно повторяющуюся последовательность, состоящую из оснований - TTAGGG (кроме цитозина). Во время каждого деления теломеры теряют 5-20 таких последовательностей, и такое укорочение продолжается до определенной критической длины, что служит сигналом к прекращению деления, после чего клетка гибнет.

Для соматических клеток есть лимит на число клеточных делений. Так, при культивировании клетки новорожденных могут делиться 80-90 раз, тогда как клетки 70-

летнего человека делятся только 20-30 раз, т.е. существует предельное число клеточных делений, или число Хейфлика. В свою очередь, жизненный цикл мейотической клетки связан с процессом оплодотворения, точнее нацелен на него.

После овуляции созревшая яйцеклетка сохраняет свою активность в течение 12-24 ч, тогда как активность зрелого сперматозоида в женских половых путях сохраняется всего несколько часов (см. ниже).

Митоз и его особенности

Митоз или деление соматической клетки, включает четыре фазы: профазу, метафазу, анафазу и телофазу. В зависимости от фазы мито-

за происходящие в клетке изменения затрагивают все структуры ядра и цитоплазмы клетки (рис. 45). В результате митоза из одной материнской клетки образуются две дочерние клетки, они имеют диплоидный набор хромосом ($2n$) и двойное количество ДНК ($2c$).

Мейоз и его особенности

Мейоз или деление половой клетки также называют гаметогенезом. В этом случае происходит следующее деление двух возникших в ходе митоза дочерних клеток на две новые клетки. В результате двух последовательных делений образуются 4 гаметы (рис. 46). В сравнении с митозом - это более сложный процесс, хотя между ними много общего.

- Мейоз включает первое и второе деления; каждое деление разделено на такие же по названиям фазы, как при митозе, но с символами I и II соответственно. Все изменения затрагивают структуру ядра и цитоплазмы.
- два деления мейоза разграничены интеркинезом. Это название напоминает интерфазу при митозе, но в данном случае нет репликации ДНК.
- В результате первого деления мейоза из исходной материнской клетки образуются две дочерние. Все они имеют диплоидный набор хромосом ($2n$) и двойное количество ДНК ($2c$).
- В результате второго деления мейоза каждая из двух образовавшихся после первого деления дочерних клеток снова делится на две. Каждая из четырех дочерних клеток имеет одинарный (гаплоидный) набор хромосом (n) и одинарное количество ДНК (c).
- Профаза первого деления мейоза имеет ряд последовательных стадий: пролептотена (премейотический митоз), лептотена, зиготена, пахитена, диплотена и диакинез.
- В результате одного сперматогенеза (мейоз у мужчин) образуются 4 функционально активные (способные к оплодотворению) гаметы. Сперматогенез начинается в период полового созревания, следует непосредственно за серией митотических делений и завершается образованием зрелых сперматозоидов.
- В результате одного оогенеза (мейоз у женщин) образуется одна функционально активная яйцеклетка (она получает всю цитоплазму исходной материнской клетки) и 3 полярных тельца (вообще не получают цитоплазму). В этой закономерности заключен эволюционный смысл «биологического

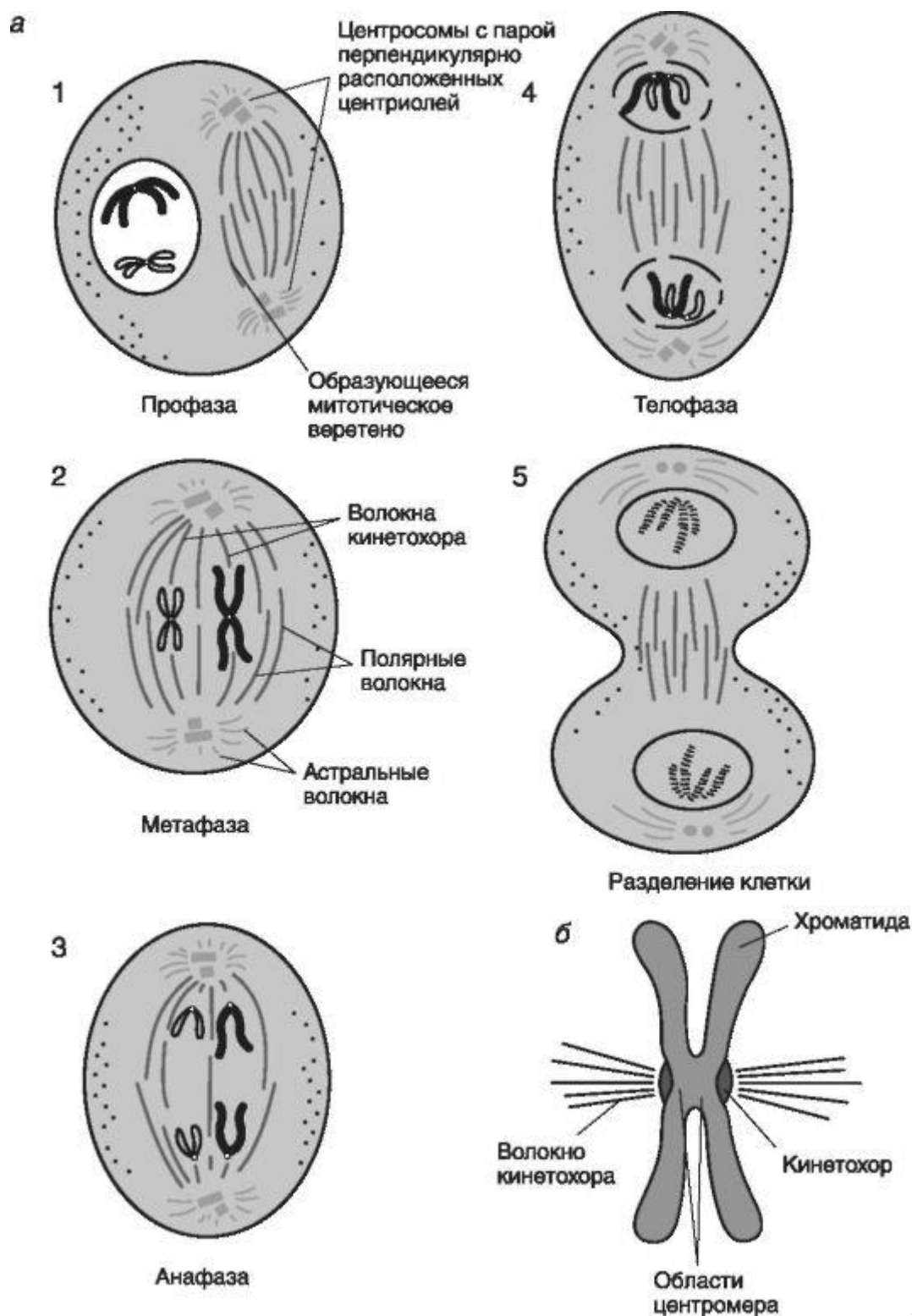


Рис.

45. Упрощенное изображение митоза (по Эллиот В., Эллиот Д., 2002): а - стадии (фазы) митоза: 1 - профаза, 2 - метафаза, 3 - анафаза, 4 - телофаза, 5 - разделение цитоплазмы. Внутрисуточные обозначения волокон, являющихся микротрубочками: астральные волокна - расположены в области полюсов клетки; волокна кинетохора - расположены (прикреплены) в области центромера (по ним перемещаются хромосомы к полюсам клетки); полярные волокна - по ним полюса клетки расходятся в разные стороны; митотическое веретено - веретено деления клетки; центросомы - каждая содержит пару перпендикулярных центриолей; б - морфология хромосомы

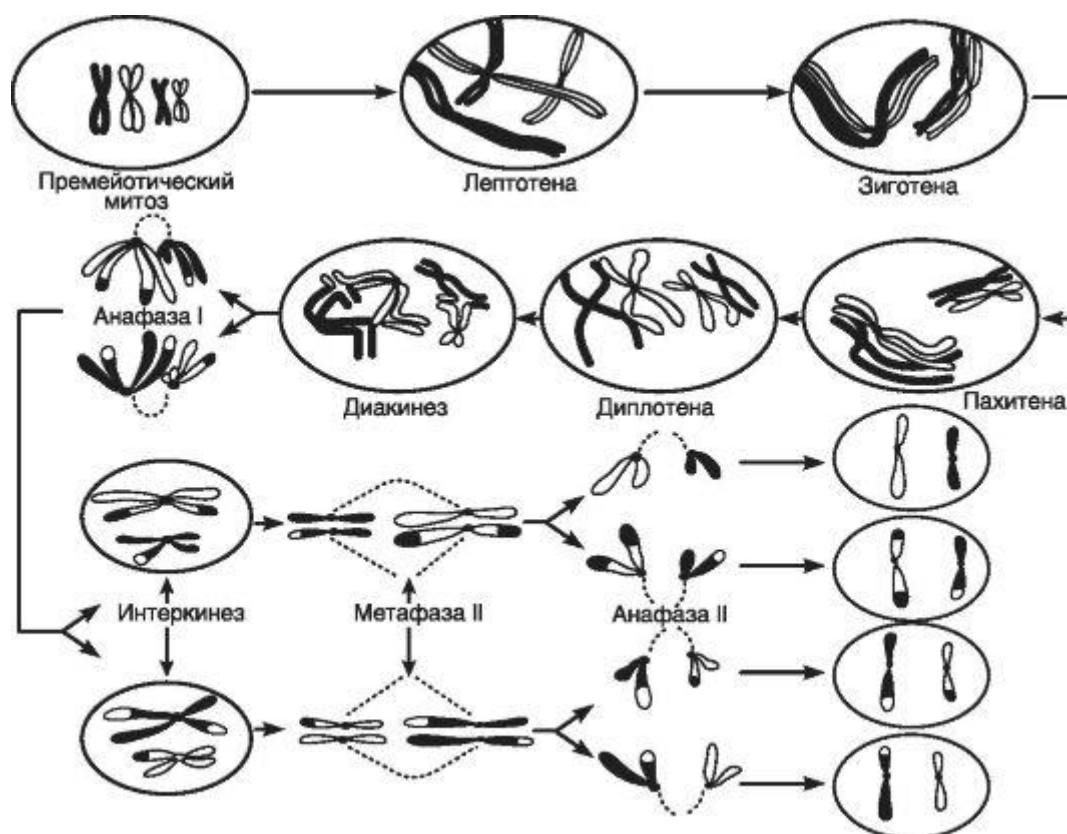


Рис.

46. Упрощенное изображение мейоза (по Эллиот В., Эллиот Д., 2002)

матриархата»: «цитоплазма материнской клетки передается всегда по линии мать-дочь и никогда по линиям мать-сын, отец-дочь, отец-сын» (см. главу 4). Оогенез начинается в эмбриогенезе, продолжается в фетогенезе, когда появляются первые пахитены мейоза (примерно 7-месячный плод). Затем оогенез прерывается на длительный период (до половой зрелости) и продолжается весь репродуктивный период, останавливаясь на время беременности, после которой снова продолжается и окончательно завершается в конце репродуктивного периода. Мало изученной особенностью женского мейоза является формирование во внутриутробном периоде развития организма девочки и сохранение до и после ее рождения резерва клетоокротоначальниц для будущих ооцитов (их около 2 тыс). Этот резерв сохраняется до наступления половой зрелости женского организма

во время репродуктивного периода уменьшается на 300-400 яйцеклеток (одна яйцеклетка созревает каждые 28 дней)*.

Повреждения структурных компонентов клетки при патологии

Любой патологический процесс в организме начинается на уровне клеточных, молекулярных, субмолекулярных (или даже аттомолярных) структур: генетических, биохимических, физико-химических. При их повреждении происходит дезорганизация клеточных функций.

Нарушения первичной структуры ДНК

Причинами нарушений первичной структуры ДНК является повреждающее действие ультрафиолетового света, рентгеновских лучей, химических соединений и других факторов окружающей среды.

Как сказано в главах 5 и 7, такого рода повреждения чаще всего ведут к генным и гораздо реже - к хромосомным мутациям, включая:

- ошибки спаривания оснований в матричной цепи ДНК, например встраивание аденина вместо цитозина с образованием АГ-пары;
- спонтанное отщепление оснований от цепи ДНК, например депуринизация и последующее отщепление пуринов;
- дезаминирование цитозина и превращение его в урацил;
- присоединение метильных или этильных групп к основаниям, что изменяет их свойства и ведет к ошибкам спаривания оснований; например, при действии УФ-света в цепи ДНК между собой сшиваются соседние тиминового основания и образуются тиминового димеры, препятствующие репликации.

При рентгеновском облучении образуются однонитевые разрывы ДНК, а более жесткие виды излучения (например, гамма-частицы) ведут к двухнитевым разрывам.

При действии ряда химических соединений (митомидин С, иприты, псоралены) образуются сшивки двух цепей ДНК.

В случае алкилирования азотистых оснований наиболее часты два типа нарушений: *первый тип* - алкилирование аминогруппы

* Известно, что в антенатальном периоде развития как женского, так и мужского организма создается также резерв нейронов (150 млрд), тогда как в течение жизни их расходуется не более 3%, или 5 млрд (см. главу 13); эта проблема также мало изучена.

гуанина, в результате чего образуется метилгуанин, связывающийся с тиминном вместо цитозина, что ведет к замене ГЦ-пары на АТ-пару в следующем цикле репликации; *второй тип* - дезаминирование 5-метилцитозина, также приводящее к замене оснований.

Кроме метильных и этильных групп, к азотистым основаниям могут присоединяться моноаддукты (более крупные химические группы), препятствующие нормальной репликации и транскрипции ДНК.

Нарушения мембран и ферментных систем клетки

Мембраны и ферментные системы клетки - это первая мишень при различных ее повреждениях. При этом не всегда ясно, как результаты повреждений связаны с этиологией и патогенезом конкретного патологического признака или фенотипа, являются ли они его причиной или следствием, так как возможны и та, и другая ситуации.

Например, при сахарном диабете основной причиной повреждения мембранных ферментов может быть свободнорадикальное окисление или гликирование их молекул, сопровождаемое нарушением регуляции экспрессии генов и увеличением количества ферментов в мембранах.

Кроме повреждения ферментов, большое значение имеет повреждение других структурообразующих компонентов мембран: фосфолипидов, ПНЖК, углеводов и т.д. В частности, при сахарном диабете в мембранах эритроцитов были обнаружены продукты окисления фосфолипидов (9-оксилинолевая кислота).

При болезни Альцгеймера в головном мозге снижается активность фосфолипаз - это необходимая компенсация в ответ на снижение скорости потери фосфолипидов. Наблюдаемые при этом рост количества глицерофосфорилхолина и увеличение активности лизофосфолипид-ацетилтрансферазы тесно связаны с изменением

метаболизма холин-содержащих фосфолипидов и участием в этих реакциях амилоидных пептидов.

Другой пример - больные шизофренией и их потомки: в одних случаях у них наблюдается снижение уровня фосфомоноэфиров - метаболитов синтеза фосфолипидов (это важный показатель риска развития заболевания), а в других случаях - изменяется состав ПНЖК в фосфолипидах мозга.

Кроме того, описано множество случаев, когда у больных с дисфункцией нейронов коры головного мозга первостепенное значение

приобретают жирнокислотный состав мембранных фосфолипидов и активность фосфолипаз.

При ишемической болезни сердца и циррозе печени в мембранах эритроцитов растёт соотношение холестерина / фосфолипиды, сопровождаемое резким снижением активности Ca^{2+} , K^{+} -АТФазы, ростом уровня СМ, ФС, ФЭ и лизоФХ (при соответствующем снижении уровня ФХ) и деформацией эритроцитов (см. главу 6).

У больных с гиперинсулинемией без диабета (имеют избыточную массу тела), количество мембранного СМ коррелирует с уровнем инсулина плазмы крови и вязкостью мембран, а также изменением степени экспонирования фосфолипидов на поверхности эритроцитов, что обуславливает нарушение асимметрии мембран, повышает их адгезивность и приводит к воспалению.

Изменения фосфолипидов обнаружены в бронхоальвеолярной жидкости у детей с дефицитом легочного сурфактанта.

У взрослых больных с бронхиальной астмой также наблюдали снижение количества сурфактанта, что коррелировало с ослаблением легочной функции.

Все эти примеры свидетельствуют: связь характера повреждений структурных компонентов мембран и ферментных систем клетки с этиологией и патогенезом конкретного заболевания каждый раз уникальна, хотя спектр самих повреждений довольно широкий.

Причины нарушений

Среди причин нарушений (повреждений) мембран и ферментных систем клетки выделены:

- мутации в генах и хромосомах;
- физические факторы: травма, резкое изменение температуры, скачки атмосферного давления, радиация, электрошок;
- химические факторы: гипертонические растворы соли, глюкоза, гормоны, ионы тяжелых металлов, кислоты, лекарства, растворители, яды;
- биологические факторы: бактерии, микроорганизмы, вирусы, вакцины и сыворотки;
- анафилактический шок и иммунные нарушения;
- дефекты обмена аминокислот и витаминов, связанные с нарушением трофики;

- избыток активных форм кислорода (АФК), которые вырабатываются во многих ферментативных и неферментативных процессах; с их гиперпродукцией связывают: адаптационные свойства кле-

ток и апоптоз, клеточные эффекты при артритах, атеросклерозе и кардиомиопатиях, нейродегенеративных заболеваниях и психических расстройствах;

- дефицит кислорода; наблюдается при ишемии, дыхательной недостаточности, анемии и отравлениях окисью углерода;
- процессы канцерогенеза и старения.

Механизмы нарушений

К механизмам нарушений клеточных мембран и ферментных систем относятся: перекисное окисление липидов (ПОЛ), активация лизосомальных гидролаз и протеиназ, эффекты продуктов расщепления фосфолипидов и др. Рассмотрим эти и сопряженные с ними механизмы.

Перекисное окисление липидов

ПОЛ (свободно-радикальное) сопровождается окислительной модификацией мембранных белков и изменением сигнальных процессов в клетке (см. главу 10). При этом образуются перекисные липидные соединения (LOOH) и интермедиаторы или промежуточные соединения, родственные LOOH.

Инициаторами ПОЛ служат молекулы АФК, в том числе:

- реакционноактивная и менее реакционноактивная формы синглетного кислорода ($1O_2'$); обе формы являются побочными продуктами распада органических гидроперекисей - это так называемая дисмутация супероксидных анионов и пероксидных радикалов; кроме того, эти формы образуются при взаимодействиях H_2O_2 и $OC1'$, катализируемых ферментом-хлорпероксидазой;
- перекись водорода (H_2O_2);
- гидроксильный (HO') и пероксидный (HO'_2) реакционноактивные радикалы;
- первичные супероксидные радикалы (O_2');
- пероксинитрит ($ONOO$) и пероксинитрокислота ($OJCHOOH$), являются продуктами взаимодействия пероксидных радикалов с ионами металлов переменной валентности (например, Fe^{2+}) или со слабо окисляющимся оксидом азота (NO').

Воздействие АФК на клеточные мембраны служит универсальным механизмом повреждения их белковых и небелковых компонентов. При этом одними из мощных цитотоксических оксидантов белков являются первичные супероксидные радикалы (O_2'), образующиеся при окислении гистидина, метионина, тирозина, триптофана и цистина.

В результате происходит инактивация белков и их агрегация с образованием поперечных сшивок. В свою очередь, образование синглетного кислорода происходит при перекисном окислении микросомальных липидов и биосинтезе простагландинов. Этот радикал разобщает сигнальные процессы в клетке, вызывая защитный эффект с индукцией МАРК (см. главу 6).

Эффекты повреждения клеток АФК суммируются с эффектами, зависящими от физико-химических свойств ферментов: сложности строения молекул, места локализации (наружная или внутренняя мембрана), характера катализируемой реакции.

Как известно, у олигомерных ферментов имеется мембранная липидная матрица, которая выполняет роль «организатора» субъединиц (протомеров или мономеров) этих белков.

Повреждение липидной матрицы нарушает пространственное расположение и координацию отдельных звеньев ферментативных путей. Например, микросомальная глюкозо-6-фосфатаза состоит из каталитического и транспортного белков, для проявления активности которых необходимы два фосфолипиды (соответственно ФХ и ФЭ), и их гидролиз под действием фосфолипаз инактивирует этот фермент.

Другими примерами липидзависимых мембранных ферментов служат транспортные K^{+} -, Na^{+} -, Ca^{2+} -, $1U^{+2}$ -АТРазы, липидное окружение которых контролирует амфифильность и микровязкость мембран. Эти ферменты высоко чувствительны к ПОЛ. Они имеют как водорастворимые, так и трансмембранные протомеры, разобщающиеся при повреждениях мембран, что ведет к инактивации ферментов.

Механизмы повреждения клетки, связанные с АТРазами, можно условно разделить на две группы: повреждение самого фермента и повреждение его липидного микроокружения, от которого также зависит активность фермента. Например, Ca^{2+} -АТРаза ведет к замедлению «оттока» ионов кальция из клетки, выравниванию их концентрации во внутри- и межклеточном пространстве, тогда как при повреждении этого фермента нарушаются гомеостаз и стабильность мембран клетки.

Кроме того, нарушение структурной организации липидного бислоя мембран может прямо воздействовать на фермент (изменяет его активный центр), что затруднит доступность субстрата, находящегося в водной фазе, и будет препятствовать его взаимодействию с ферментом.

Следовательно, разрушительное действие АФК на клеточные мембраны инициируется реакциями цепного окисления мембранных фосфолипидов. Эти реакции начинаются с внедрения в мембраны свободных радикалов (в основном $NO^{\bullet}$), которые вступают во взаимодействие с ПНЖК фосфолипидов, разрывают в них СН-связи около атома углерода, соседнего с двойной связью ($-CH=CH-CH_2-$), и формируют липидные радикалы или гидроокислы.

Затем липидные радикалы обуславливают появление широкого спектра продуктов деградации фосфолипидов и изменяют свойства мембран.

В ходе окисления фосфолипидов также происходит образование мембраноактивных лизофосфолипидов, которые (как и их гидроокислы) дезорганизуют липидный бислой, увеличивая толщину мембраны, фрагментацию везикул, вытесняя белки из гидрофобной зоны в поверхностную зону мембраны. Эти нарушения изменяют заряд мембраны и конформацию липопротеиновых комплексов, обуславливают появление гидрофильных участков в гидрофобном слое и как следствие нарушают проницаемость и стабильность мембраны (вплоть до ее разрыва).

В свою очередь, перекисному окислению с образованием собственных гидроперекисей подвергается мембранный холестерин.

К сопряженным с ПОЛ реакциям относится изменение роли $NO^{\bullet}$ в свободно-радикальных процессах. Известно, что $NO^{\bullet}$ служит регулятором образования АФК и «тканевого (митохондриального) дыхания». Эта маленькая молекула связывается с

цитохромоксидазой и ингибирует аэробный метаболизм, контролируя скорость входа кислорода в дыхательную цепь митохондрий, что способствует накоплению оксиданта-пероксинитрита.

Кроме того, гидроокислы фосфолипидов могут независимо от АФК инициировать повреждение мембранных белков, что еще больше усугубляет повреждение мембран. В этих случаях пусковым механизмом служат две реакции: взаимодействие сульфгидрильных групп (SH) цистеина со свободными радикалами; образование дисульфитов и сульфоновой кислоты. Пример такого повреждения - это формирование белковых агрегатов в хрусталике глаза при катаракте.

Кроме цистеина, окислению в ходе ПОЛ подвергаются аргинин, гистидин, метионин, пролин, серин, тирозин, фенилаланин (включая их производные), а также гемсодержащие белки. Деструкция этих аминокислот делает их доступными для гидролиза под действием

протеаз, для которых окисленные аминокислотные остатки служат маркерами.

Образование комплексов белков с липидами также происходит в виде двух реакций: формирования ковалентной связи между свободными SH-группами аминокислот и альдегидами (карбокисильные группы окисленных липидов); образования полимерных продуктов за счет формирования поперечных сшивок в белковых молекулах.

При действии АФК возможно их участие в трансдукции сигналов от мембранных рецепторов. В ходе такой трансдукции АФК генерируются совместно с NO' при участии НАДФН-оксидазной системы и NOS-системы. Благодаря такому совместному действию АФК и NO' формируется механизм так называемой редокс-регуляции, нарушение которой повреждает сигнальные белки в клеточных мембранах (см. главу 10).

Активация лизосомальных гидролаз и протеиназ

Происходящая при повреждениях цитоплазмы клетки активация лизосом связана с освобождением из них гидролаз и протеиназ, которые разрушают мембраны, запуская события некротической гибели клетки (см. главу 11). Такой механизм включается при интоксикации гепатотропными ядами, к которым относятся: афлатоксин, галактозамин, змеиный яд, хлорпромазин, четыреххлористый углерод (CCl₄) и др. Эти яды освобождают в печени многие ферменты: ДНКазы и РНКазы, гидролазы и протеиназы (гамма-глюкуронидаза и кислая протеиназа). Изменение активности лизосом может быть вызвано действием ионов Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, витаминов А и Е, фосфолипаз, прогестерона, продуктов ПОЛ и других соединений. При освобождении из лизосом кислых липаз (фосфолипаз) происходит ферментативный гидролиз структурообразующих компонентов (нуклеопротеины) и энергосберегающих веществ (гликоген) клетки.

В свою очередь, активация лизосомальных ферментов при холестазе связана с разрушением мембран лизосом под действием желчных кислот.

Эффекты продуктов расщепления фосфолипидов

При гидролизе фосфолипидов, сопровождающемся активацией фосфолипаз, растворимые в воде PLA₂ оказывают мембранолитическое действие, вызывая появление дырок и последующий разрыв мембран.

В зависимости от нуклеотидной последовательности генов, кодирующих PLA₂, были выделены 10 групп фосфолипаз (I-X), включая

изоформы секреторной (sPLA₂), цитозольной Ca²⁺-зависимой фосфолипазы (cPLA₂) и цитозольной Ca²⁺-независимой фосфолипазы (iPLA₂). Для этих групп показано их участие в:

- апоптозе, некрозе, транслокации к внутриклеточным мембранам (фосфолипаза cPLA₂);
- функциях, связанных с аллельными формами генов, приводящими к разной экспрессии (фосфолипаза iPLA₂);
- процессе воспаления (фосфолипаза sPLA₂);
- фракциях фосфолипидов в липопротеинах плазмы крови (фосфолипаза sPLA₂).

В последних двух случаях субстратами служили: фактор активации тромбоцитов (PAF) или продукты окислительного и ферментатического расщепления фосфолипидов.

Показана также способность всех групп фосфолипаз освобождать арахидоновую кислоту (субстрат для простагландин-Н-синтазы) при воспалении и ишемии (реперфузии).

Арахидоновая кислота выступает в роли модулятора повреждения клеток при действии лекарств, оксидантов и токсинов, гидролизующих фосфолипиды, повышающие проницаемость мембран и вызывающие лизис клеток. Кроме того, арахидоновая кислота служит субстратом для циклооксигеназы, участвующей в образовании эйкозаноидов (простагландины, простациклины и тромбоксаны), а под влиянием 5-липоксигеназы превращается в лейкотриены, которые регулируют проницаемость сосудистой стенки и являются хемотаксантами для нейтрофилов.

Механизмы повреждения структурных компонентов клеток печени

В настоящее время доказана способность нескольких миллионов химических соединений и более чем 300 лекарственных препаратов повреждать клетки печени - главного органа, в котором происходит метаболизм ксенобиотиков (чужеродных веществ), поступающих в организм с пищей, вдыхаемым воздухом, кровотоком (при переливании крови и ее заменителей) или парентерально. При этом пусковым механизмом является повреждение клеточных мембран гепатоцитов за счет либо прямого действия вирусов, ядов или токсинов, либо опосредованного действия продуктов окислительного стресса и других эндогенных факторов.

К механизмам повреждения структурных компонентов клеток печени также относятся: повреждение лекарственными препаратами, механическое повреждение цитоскелета и его отсоединение

от мембраны (способствует растяжению и разрыву), воздействие на мембранные белки или их комплексы ионами тяжелых металлов, бактериальными токсинами, ядами и другими соединениями.

Клетки печени особенно чувствительны к гипоксии и низкому содержанию гликогена. Так, если гликогена в гепатоцитах мало, в них угнетается синтез АТФ, блокируются АТФ-зависимые метаболические пути (синтез жирных кислот и гликогеногенез). В результате разрушается мтДНК и снижается функционирование митохондрий, что вызывает некроз клетки*.

В зависимости от механизма патогенеза при поражениях печени выделено четыре основных патологических фенотипа.

- Цитолиз (некроз гепатоцитов). Связан с нарушением проницаемости плазматической и внутриклеточных мембран, выходом в кровь и межклеточное пространство внутриклеточного содержимого, что ведет к увеличению концентрации билирубина, витамина B₁₂ и Fe²⁺ и в конечном итоге повышает активность ферментов, участвующих в некрозе.
- Холестаз или нарушение желчевыводящей функции печени. Связан с повреждением цитоскелета гепатоцитов и приводит к обратному оттоку желчи в синусоиды печени.
- Синдром печеночно-клеточной недостаточности. Этот синдром приводит к нарушению синтетической и детоксицирующей функций печени, развитию гиперазотемии, падению активности холинэстеразы в крови.
- Иммуновоспалительный синдром. Этот синдром связан с сенсibilизацией иммунокомпетентных клеток и активацией клеток ретикулоэндотелиальной системы.

Рассмотрим более подробно механизмы лекарственного повреждения клеток печени. Согласно данным W. Lee (2003), при действии лекарств наиболее частыми механизмами повреждения клеток печени являются:

- метаболические преобразования лекарства с участием цитохрома P₄₅₀ и образованием аддуктов (ковалентное присоединение к молекуле цитохрома P₄₅₀ (см. главу 10);
- миграция образовавшихся аддуктов (лекарство и цитохром P₄₅₀) к клеточной поверхности и инициация на ней иммунных реакций,

* В настоящее время не вызывает сомнений, что молекулярные повреждения гепатоцитов человека индуцируют не только их некроз, но и апоптоз (см. главу 10).

обеспечивающих образование антител и гаптен-антител, прямое действие NK-клеток и Т-клеток;

- образование конъюгатов лекарства с внутриклеточными белками, что обуславливает дисфункцию органелл, нарушает ионный градиент, снижает уровень АТФ, вызывает деградацию белка-актина, набухание, лизис и некроз гепатоцитов;
- воздействие на транспортные белки каналикулярной мембраны и инициация холестаза с последующей стимуляцией апоптоза гепатоцитов;
- вторичный цитокиновый ответ, инициирующий воспаление и каскад иммуноопосредованных реакций, ведущих к апоптозу гепатоцитов с участием факторов Fas и TNF;
- действие лекарства на митохондрии, что ведет к разобщению реакций окислительного фосфорилирования, ингибированию синтеза АТФ и окислению жирных кислот с последующим развитием ацидоза и внутриклеточным накоплением микровезикул с триглицеридами.

Приведенный перечень механизмов лекарственного повреждения печени, по-видимому, не совсем полный. Это подтверждается отсутствием удовлетворительного ответа на вопрос: почему лекарство, являющееся безопасным для клеток печени у большинства больных с заболеваниями разной природы, вдруг оказывается гепатотоксичным для кого-то одного из них. Исчерпывающий ответ на этот вопрос, скорее всего, базируется на данных, указывающих на генетические вариации белков, способствующих образованию токсичных продуктов и соответствующих конформационным вариациям изоферментов, участвующих в образовании аддуктов с цитохромом P₄₅₀.

Поэтому причину идиосинкразии на вводимый лекарственный препарат, вероятно, можно объяснить (хотя бы частично) генетическими вариациями молекулы цитохрома P₄₅₀, обладающего разной каталитической активностью (его у человека не менее 50 форм). Следует также указать на связь механизмов лекарственного повреждения гепатоцитов с ПОЛ плазматических мембран. В частности, ПОЛ не только индуцирует в мембранах характерные нарушения, но и активирует действие фосфолипаз и протеаз на микрофиламенты клетки, нарушая их фиксацию в мембранах или реструктурируя актин, вызывающий некроз.

По такому механизму действуют, например, лекарства, метаболизируемые этанолиндукцируемой формой цитохрома P₄₅₀ (GYP 2E1).

Этот фермент вызывает развитие окислительного стресса через генерацию АФК. При этом погибшие под действием этанола гепатоциты и купферовские клетки в дальнейшем служат источниками эндотоксинов.

Кроме того, повреждение мембран ЭР в печени может сопровождаться инактивацией цитохрома P₄₅₀ и нарушением процессов гидроксилирования лекарств, пищевых добавок, токсических веществ, различных ядов и канцерогенов (см. главу 10). К таким веществам, например, относятся: алкилирующие агенты, гелиотрин, тиацетамид, СС14 и эндогенные субстраты (жирные кислоты, простагландины, стероиды и холестерин).

ГЛАВА 10 ФОРМЫ ГИБЕЛИ КЛЕТКИ

Общие данные

Формы гибели клетки определяются характером и степенью ее повреждения. Они зависят от типа клетки, энергетического статуса (уровень АТФ) и иммунного статуса (активность Т-киллеров).

Известны следующие основные формы гибели клетки или прекращения ее биологической активности с последующим фагоцитозом остатков - это апоптоз (программированная гибель), некроз (гибель при повреждении) и смешанные формы.

В частности, при необратимой гибели клеток почечной ткани, индуцированной токсинами или острой почечной недостаточностью, некроз может включать элементы апоптоза.

В ацинарных клетках поджелудочной железы наблюдается форма апонекроза (некрозоподобный фенотип).

В исследованиях *in vitro* на культуре клеток 293Т выделена форма параапоптоза, неапоптотического типа программированной гибели с частично апоптотической морфологией, набуханием митохондрий, но без фрагментации ядра клетки.

Кроме того, высказано предположение о существовании апоптозонекротического континуума, определяемого перекрестным взаимодействием процессов гибели клетки и процессов сохранения гомеостаза (cross-talk).

Все указанные формы гибели клетки отличаются по своим морфологическим, молекулярно-биохимическим и клиническим критериям.

Морфологические критерии апоптоза и некроза

Морфологические критерии апоптоза и некроза приведены на рис. 47.

Для *апоптоза* характерны: конденсация хроматина, целостность плазматической и внутриклеточных мембран, набухание митохондриальных мембран.

При апоптозе клеточное содержимое не попадает в межклеточное пространство и не вызывает воспалительной реакции, так как остатки клетки фагоцитируются макрофагами или соседними клетками.

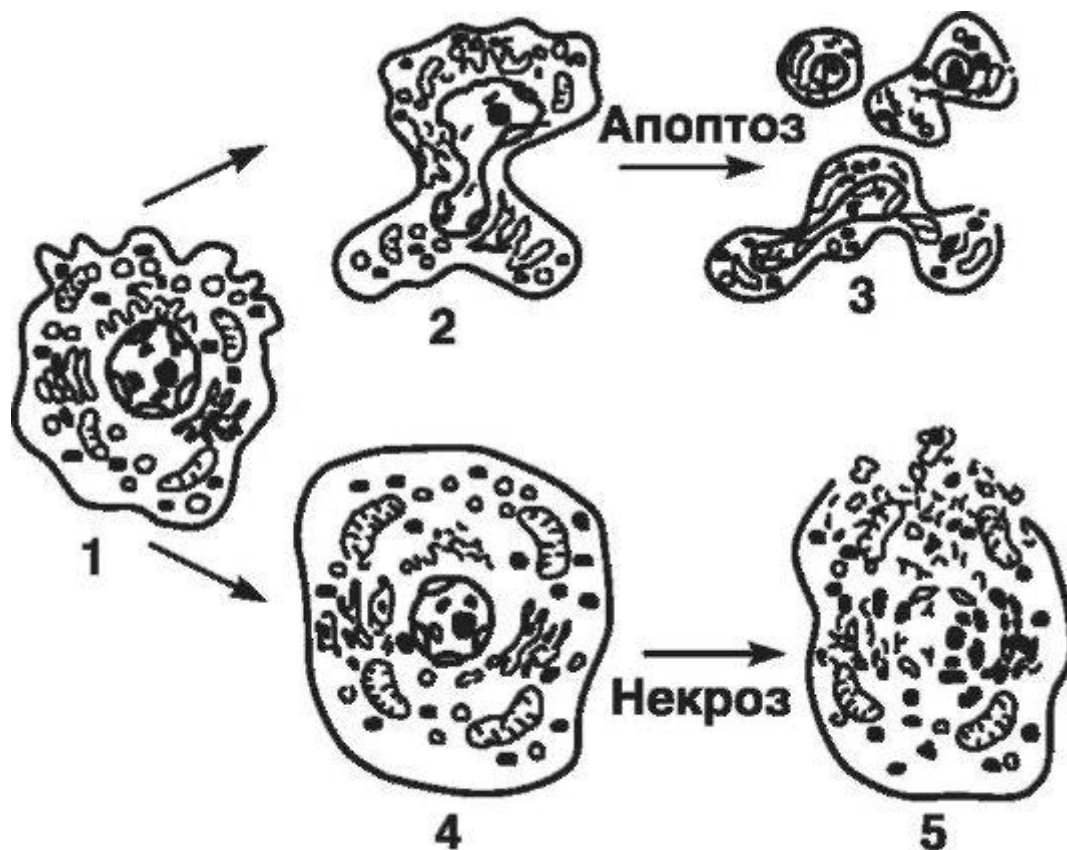


Рис.

47. Морфологические изменения клетки при апоптозе и некрозе (по Самуилову В.Ф., 2001):

1 - нормальная клетка; 2 - апоптическое сморщивание с образованием пузырьчатых выростов; 3 - фрагментация мембраны с образованием апоптотических телец; 4 - набухание и некротическая дезинтеграция клетки

Для *некроза* характерны: набухание всей клетки и всех ее органелл, разрыв плазматической и внутриклеточных мембран, активация лизосомных ферментов и воспалительная реакция (в результате попадания внутриклеточного содержимого во внеклеточную среду).

ХАРАКТЕРИСТИКА АПОПТОЗА

В здоровом организме процесс апоптоза сбалансирован процессом физиологической регенерации клетки. Апоптоз - это генетически контролируемый молекулярный (биохимический) механизм, ответственный за поддержание постоянной численности нормальных клеток, выбраковку и удаление дефектных клеток и, следовательно, выживание, старение и смерть клеток и тканей организма. Как правило, апоптоз - это результат опосредованного (через рецепторные системы клетки) неспецифического или нефизиологического действия внешних факторов, выступающих как индукторы, способные при интенсивном воздействии вызвать гибель клетки. Вместе с тем, апоптоз

связан с внеклеточными и внутриклеточными сигналами, выступающими в роли мощных физиологических факторов.

Прежде всего, к таким факторам относятся *гормоны* (например, половые гормоны), которые либо индуцируют, либо ингибируют гибель клетки в зависимости от стадии ее дифференцировки (см. главы 9 и 14).

Другими физиологическими факторами являются *цитокины* или продуцируемые клетками сигнальные (полифункциональные) пептиды, связывающие специфические рецепторы на клетках-мишенях. В зависимости от функции цитокины делятся на факторы роста, факторы семейства TNF, интерлейкины и интерфероны (см. главу 8). Действие цитокинов на клетки неоднозначно (так же как у гормонов): для одних клеток они являются индукторами, для других - ингибиторами апоптоза, что связано с типом клетки, стадией дифференцировки, функциональным состоянием. Следовательно, запрограммированная гибель клетки зависит от соотношения специфических и неспецифических регуляторов (физиологических и нефизиологических).

Молекулярно-биохимические критерии апоптоза

К молекулярно-биохимическим критериям апоптоза относятся:

- энергозависимость; определяется самой клеткой благодаря наличию АТФ (соотношение в клетке АТФ/АДР);
- расщепление ядерной ДНК на фрагменты, кратные 180-200 н.п., что приводит к формированию на электрофореграмме ДНКовой лестницы;
- уменьшение объема клетки; клетка сморщивается в течение нескольких минут, теряя до 1/3 своего объема;
- активация цистеиновых протеаз (каспаз), вызывающих деградацию белков;
- экстернализация или появление ФС на наружной поверхности плазматической мембраны; связана с формированием из мембраны апоптотических телец (фрагментов), способствующих их узнаванию макрофагами и последующему фагоцитозу.

Фазы апоптоза

Выделены четыре фазы апоптоза: инициация апоптотического сигнала (*первая*), трансдукция или проведение апоптотического сигнала (*вторая*), активация каспаз (*третья*), деградация ДНК (*четвертая*).

Инициация, трансдукция и проведение апоптотического сигнала

В зависимости от характера стимула, инициирующего апоптоз, выделяют два сигнальных каскада (пути): рецепторный и митохондриальный.

Рецепторный путь опосредован специфическими «рецепторами смерти», расположенными на плазматической мембране - это факторы TNF.

Наиболее изучен рецептор Fas (Fas-R), или CD95. Его цитоплазматический домен обогащен цистеином, а интегральная (мембранная) часть содержит «домен смерти», или DD, вовлекаемый в белокбелковое взаимодействие с генерацией «сигнала смерти». Лиганд этого рецептора (Fas-L) относится к цитокинам - пептидам из семейства TNF; он экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах и естественных киллерах. Связывание

лиганда Fas-L с рецептором Fas-R приводит к олигомеризации последнего и формированию сигнального комплекса, инициирующего каскад реакций апоптоза.

В олигомеризации Fas-R участвуют: цитоплазматический DD-домен рецептора, адапторный пептид FADD (Fas- ассоциированный DD, содержащий DED-эффекторный «домен смерти») и прокаспазы-8. Образование этих белков активируют каспазы-8 (см. ниже), что вызывает каскад апоптотических реакций.

В последние годы установлено, что мутации в генах Fas и Fas-L обуславливают развитие ряда аутоиммунных заболеваний, а в случае появления опухолевых клеток активность каспазы-8 может ингибироваться специфическим белком FLIP, препятствующим апоптозу.

Также описан апоптоз, инициированный связыванием рецепторов семейства TNF, содержащих домены DD (TNF-R), с лигандом TRAIL. Их олигомеризация аналогична Fas-R / Fas-L и осуществляется с участием FADD и сходного с ним пептида TRADD (TNF- R- ассоциированный DD). Все указанные примеры характеризуют рецепторный путь апоптоза.

Активация каспаз

Каспазы - это специфические цистеиновые протеазы, катализирующие расщепление белков. Они считаются ключевыми ферментами апоптоза, расщепляющими пептидную связь по карбоксильному концу остатка аспарагиновой кислоты, что ведет к активации или инактивации белка. Мишенями для каспаз служат белки, деградация которых вызывает развитие характерных для апоптоза необратимых процессов - это мембранные белки, белки ядра и цитоплазмы клетки.

Выделено 14 типов каспаз, синтезируемых в виде зимогенов или прокаспаз (имеют большой молекулярный вес), которые затем активируются путем протеолитического процессинга.

В зависимости от функции семейство каспаз делится на 2 подсемейства.

- *Первое подсемейство* - это каспазы-1, -4 и -5, участвующие в созревании цитокинов. Сюда также относятся интерлейкин-1 бета и интерлейкин-18, усиливающие противовоспалительные свойства цитокинов.
- *Второе подсемейство* - это каспазы, участвующие в ферментативном каскаде реакций апоптоза. Среди них выделяют эффекторы (гидролизуют структурные белки) и индукторы (принимают и передают апоптотические сигналы).

В неповрежденной клетке активность каспаз регулируется путем:

- взаимодействия индуктора апоптоза со специфическими рецепторами, например, активация каспазы-8 в Fas/Fas-L системе;
- образования гетеродимеров каспаз со специфическими регуляторными белками семейства Bcl-2 (см. ниже);
- взаимодействия каспаз с сериновой протеазой или гранзимом B (GrB) при воздействии цитотоксических Т-лимфоцитов.

Высказаны предположения, что действие каспаз на белки цитоскелета клетки приводит к изменению ее формы и что ингибиторы каспаз не полностью блокируют сморщивание клетки.

В апоптозе может участвовать *цитозольная фосфолипаза*, которая служит субстратом для каспаз 2 и 8 (см. главы 6 и 10). Возможно, что инактивация цитозольной фосфолипазы ведет к снижению синтеза противовоспалительных простагландинов, образующихся из арахидоновой кислоты, которая является продуктом гидролиза фосфолипидов.

Для TNF-индуцированного апоптоза также показана активация каспазой-3 цитозольной фосфолипазы.

Участие фосфолипаз, вероятно, усиливает повреждение лизосом, что связано с наличием «*лизосома-митохондриальной оси*» апоптоза, определяющей эффекты каспаз, лизосомных гидролаз и генерацию митохондриями АФК. На рис. 48 показаны некоторые пути передачи апоптозного сигнала в клетке, включая митохондриальный путь, при котором действие индукторов апоптоза ведет к резкому снижению величины электрохимического потенциала митохондрий и сопровождается выходом в цитоплазму цитохрома-с, который инициирует активацию каспаз.

Наряду с выходом в цитоплазму цитохрома-с возможно высвобождение митохондриями других медиаторов: прокаспаз-2, -3 и -9, AIF, эндонуклеазы G, что, по-видимому, контролируется белками

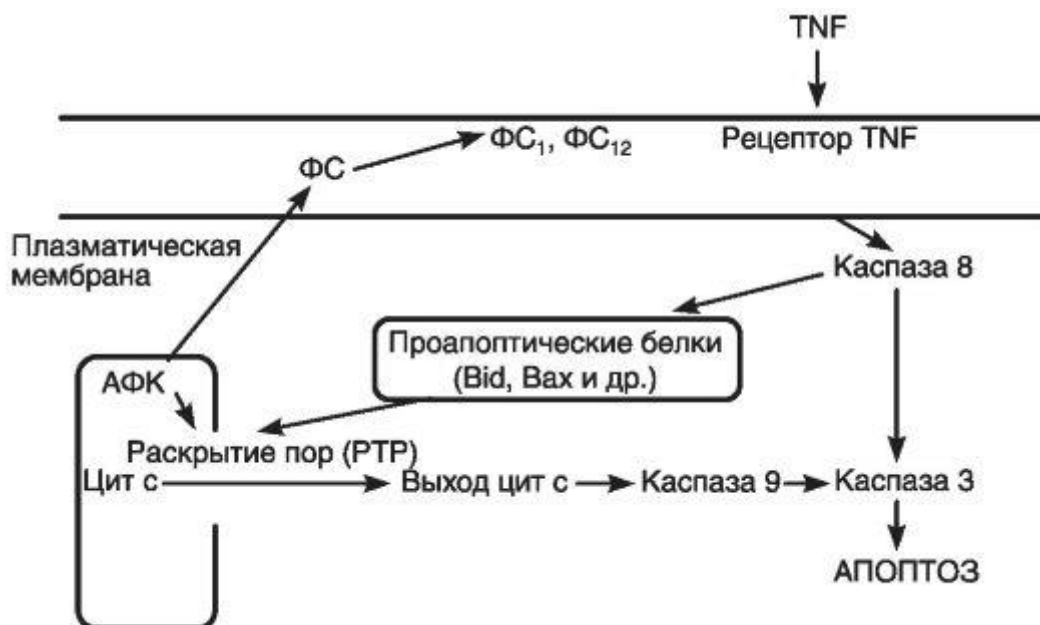


Рис. 48.

Некоторые пути передачи апоптозного сигнала в клетке (по Скулачеву В.П., 2001)

семейства Bcl-2 (см. выше), которые кодируются одноименными генами и относятся к наиболее известным внутриклеточным регуляторам апоптоза (для них характерны гомологичные домены или домены BH 1-4).

В зависимости от функции среди этих регуляторов апоптоза выделяют: антиапоптотические белки (Bcl-2, Bcl-3, Bcl-x, Mcl-1) с доменами BH 1, 2, 4 и проапоптотические белки (Bid, Bad, Bax, Bim) с доменом BH 3. Например, белок Bid (tBid) взаимодействует с митохондриальными липидами, индуцируя высвобождение эндонуклеазы G и внедрение лизофосфолипидов (особенно лизоФХ) в мембрану митохондрий с последующим ее разрывом. В этом случае эффект разрыва мембраны, вероятно, связан с «заякориванием» С-концевых доменов проапоптотических белков Bcl-2, что способствует их воздействию на мембраны эндоплазматического ретикулума и митохондрий с возможным формированием в них гигантских транзитных пор (РТР) или мегаканалов.

Считается, что соотношение белков этого семейства определяет предрасположенность или устойчивость клеток к апоптозу. Важной общей чертой для митохондриального и рецепторного путей апоптоза

является деполяризация (деинтеграция) митохондрий, сопровождающаяся глубокими изменениями проницаемости их мембран с последующим образованием мегаканалов. Одним из них служит неспецифический канал, образующийся при окислении SH-группы Cys-56 в аденин-нуклеотидтранслоказе - это белок внутренней мембраны митохондрий, осуществляющий антипорт АТФ/АДФ (см. главу 6). Этот мегаканал (PTP-комплекс) содержит множество мишеней для внешнего воздействия и регулируется такими эндогенными факторами, как АФК и оксид азота, либо изменениями электрохимического потенциала митохондрий и концентрации ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , а также изменениями соотношений АТФ и АДФ, липидов и белков, белков Bcl-1 и Bcl-2 и др.

Считается, что гигантская пора интегрирует ответные реакции клетки на стрессовое воздействие, и ее раскрытие происходит практически при всех процессах клеточной гибели, что изменяет проницаемость митохондрий.

Деградация ДНК

Если начальные стадии апоптоза различаются в зависимости от типа клеток и индуцирующих сигналов, то фаза деградации ДНК универсальна для большинства клеток. Это необратимая терминальная стадия апоптоза, контролируемая белками семейства Bcl-1 и Bcl-2.

К хорошо изученным ядерным белкам-регуляторам апоптоза относится белок p53 (мол. масса 53 кДа) или фактор транскрипции, запускающий апоптоз и блокирующий процесс деления клетки с поврежденной ДНК - это *первая особенность апоптоза*. Так, на ранних стадиях повреждения ДНК экспрессия фактора p53 повышается, что блокирует клеточный цикл в фазах G₁ и G₂ (см. главу 9) и предоставляет клетке возможность репарировать поврежденную ДНК фосфолипазой PLA₂, предотвращая тем самым появление мутаций.

Если активность клеточных систем репарации недостаточная (см. главу 11) и повреждения в ДНК сохраняются, то в таких клетках индуцируется апоптоз.

Накопление в клетке фактора p53 возможно при обоих путях апоптоза.

Вместе с тем, почти у 50% типов изученных опухолевых клеток ген p53 был инактивирован, и связанная с ним регуляция клеточного гомеостаза была нарушена, что приводило к накоплению дефектных клеток.

Вторая особенность апоптоза - это концентрация в цитоплазме свободного ионизированного кальция. Повышение его уровня способствует запуску апоптозного митохондриального каскада сигналов, инициирующего образование транзитных пор и выход в цитоплазму цитохрома-с и эндонуклеазы G.

В освобождении кальция из клеточных депо принимают участие вторичные мессенджеры: дилицерид и инозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃), генерация которых в клетке связана с активацией разных изоформ фосфолипазы C (см. выше).

С нарушением нормального гомеостаза кальция связана инициация апоптоза некоторыми токсинами. Однако для этого необходимо сохранение основного пула АТФ, иначе клетка может перейти к другому механизму гибели - некрозу (см. ниже).

Роль фосфолипидов и других соединений в апоптозе

Завершение апоптоза - это фаза фрагментации погибшей клетки на «апоптотические тельца». В этой фазе наиболее существенные процессы протекают в плазматической мембране, где происходит перераспределение фосфолипидов, а во внешней мембране наблюдается экстернализация ФС, его присоединение к ней (транслокация) и последующее окисление (см. главу 6).

Транслокация ФС осуществляется с участием Ca^{2+} - активированной скрамблазы и КЛ митохондрий (в случае свободнорадикального окисления). Эта скрамблаза - сигнал к поглощению «рецептора внешнего ФС», который экспрессируется в разных клетках и тканях, и благодаря этому «апоптотические тельца» захватываются и перевариваются не только фагоцитами, но и соседними клетками. При этом рецепторы к ФС оказывают противовоспалительное действие, подавляя иммунную реакцию фагоцитирующей клетки. Кроме того, в апоптотической клетке возрастает генерация лизоФХ, который служит хемотаксическим фактором - источником сигнала «*seek me*», стимулирующего приток фагоцитов к данной области.

В апоптоз вовлечены в качестве сигнальных вторичных мессенджеров такие производные фосфолипидов, как церамиды, сфингозин и SIP, способные к регуляции как процессов выживания, так и гибели клетки.

Например, церамид регулирует ключевые факторы апоптоза: полярное перераспределение и олигомеризацию рецептора Fas с формированием суперкаталитического домена, дестабилизацию митохондриальных мембран (путем участия Вах-индуцированных неспецифических

церамидных пор и повышения проницаемости мембран), а также высвобождает апоптогенные факторы, например, цитохром-с. В свою очередь, сфингозин (производное церамида) усиливает апоптоз под действием церамидаз, ингибируя протеинкиназу С (см. главу 6).

Из церамида же образуется SIP или сигнальный липид, обладающий антиапоптотическими свойствами. Его эффекты реализуются с помощью четырех механизмов:

- активации антиапоптотических сигнальных путей (NFkB, ERK- киназа);
- снижения в лимфоцитах экспрессии проапоптотических белков Bcl-2 (Вах), блокирующих апоптоз (см. выше);
- антиапоптотического действия по предотвращению процессов, индуцированных стрессом в митохондриях (блокирование выхода цитохрома-с и активации каспаз);
- блокирования апоптоза в эндотелиальных клетках путем повышения уровня оксида азота.

В последние годы была также продемонстрирована специфическая роль в апоптозе мембранных рафтов, что связано с регуляцией ионных каналов и сборкой сигнальных комплексов (см. главу 8). При этом индукторы апоптоза вызывали реорганизацию рафтов и их укрупнение в большие «мембранные платформы», обогащенные церамидами.

Завершая рассмотрение механизмов апоптоза, следует отметить, что повреждение клеточной мембраны не является его первопричиной, хотя и служит важной составляющей механизма апоптоза (здесь происходят олигомеризация и наружная ориентация апоптозных рецепторов и локализуются многие апоптотические сигналы, включая экстернализацию ФС).

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКРОЗА

Некроз - это форма пассивной гибели клетки под действием внешних факторов, на которые клетка не может или не успевает отреагировать с помощью собственных защитных систем. В результате происходит нарушение клеточных функций (в первую очередь повреждаются клеточные мембраны).

В зависимости от своей природы факторы, вызывающие некроз, делятся на физические, химические и биологические (биогенные). Устойчивых к ним клеток в живой природе нет.

Молекулярно-биохимические механизмы некроза

Биохимические механизмы некротической гибели приведены на рис. 49.

В этих механизмах ключевую роль играют три сопряженных процесса:

- резкое повышение концентрации в цитозоле ионов Ca^{2+} ;
- разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях с истощением запасов клеточного АТФ;
- увеличение проницаемости плазматической мембраны и ее повреждение.

Все сопряженные процессы относятся к деструктивным. Они протекают одновременно и взаимосвязанно, и каждый процесс усиливается генерацией АФК и нарастающим окислительным стрессом. Вместе с тем процесс увеличения проницаемости плазматической мембраны и ее повреждение - это еще обратимый этап некроза. Поэтому важной основой для эффективного терапевтического воздействия на погибающие в ходе некроза клетки является направленное торможение или блокирование всех трех сопряженных процессов, если оно сочетается с репарацией поврежденных мембран.



Рис. 49.

Биохимические процессы при некротическом повреждении клетки (по Bhatia M., 2004)

Механизмы некроза зависят от характера патогенного воздействия, структурных и функциональных особенностей поврежденной ткани, а также конституциональных особенностей организма.

Типы некроза

В зависимости от механизмов развития различают два типа некроза: *первый тип* - это прямое или непосредственное травматическое (токсическое) воздействие; *второй тип* - это не прямое или опосредованное воздействие через нейроэндокринную или сердечнососудистую системы организма. Например, при первом типе некроза происходит резкое энергетическое «истощение» клеток: разобщаются митохондриальные процессы окислительного фосфорилирования, существенно снижается синтез АТФ, нарушается работа АТФ-зависимых ионных каналов, утрачивается регуляция ионного гомеостаза и разрушаются белки цитоскелета клетки. При этом плазматическая мембрана теряет способность регулировать клеточный объем и ионную проницаемость. В результате усиливается транспорт ионов, нарушается осмотическое равновесие, увеличивается концентрация ионов Na^+ в цитозоле.

В свою очередь, реакции резкого истощения активируют Na^+ -, K^+ -АТФазу, что еще больше истощает запасы АТФ, способствуя набуханию митохондрий и развитию отека клетки.

В самом начале повреждения ионный гомеостаз еще поддерживается одновременным оттоком ионов K^+ , однако в дальнейшем ионные насосы блокируются, и приток в клетки ионов Na^+ и воды увеличивается.

В последние годы на различных клеточных культурах была показана роль некоторых ионных насосов и трансмембранных каналов в развитии некротического процесса. Среди них: Na^+ / K^+ -насос; Na^+ / H^+ - и Na^+ / Ca^{2+} -ионные каналы; Na^+ -, K^+ -, 2Cl^- -котранспортер.

Например, неспособность клеточных мембран поддерживать низкую концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме и регулировать гомеостаз митохондриального Ca^{2+} лежит в основе необратимости молекулярно-биохимических нарушений при ишемии мозга и миокарда, ряде аутоиммунных заболеваний и других болезней, а также при цитотоксическом воздействии многих химических соединений, включая лекарства.

Высокие концентрации Ca^{2+} в цитоплазме в условиях окислительного стресса раскрывают в митохондриях транзитные поры (как при

апоптозе), что снижает митохондриальный трансмембранный потенциал, приводит к деградации K^+ -АТФазы и еще больше усиливает повреждение мембраны.

Наряду со снижением мембранного потенциала нарушается осмотический баланс между матриксом и межмембранным пространством митохондрий, после чего в матрикс поступает вода, вызывая его набухание и разрыв наружной мембраны. В результате в поврежденных митохондриях резко снижается генерация АТФ и наступает некроз клетки.

Раскрытие пор и увеличение проницаемости митохондриальных мембран контролируют специфические вторичные мессенджеры (и проапоптотические белки семейства Bcl-2 - см. выше), что характерно для атеросклероза, сахарного диабета, нейродегенеративных заболеваний, процессов старения и цитолитического гепатита.

РАЗЛИЧИЯ И ОБЩНОСТЬ АПОПТОЗА И НЕКРОЗА

Некроз отличается от апоптоза следующим. При некрозе:

- наблюдается аутолиз клетки, и ее содержимое изливается в межклеточное пространство, где развивается процесс воспаления;
- отсутствует зависимость от энергетического статуса клетки;

- отсутствует генетический контроль с помощью специфических белков-регуляторов;
- в процесс одновременно вовлечена большая группа соседних клеток и тканей, подвергшихся общему интенсивному воздействию повреждающих факторов;
- структурно-функциональные изменения в клетке подчинены сопряженным друг с другом общим молекулярно-биохимическим закономерностям, первопричиной которых служит нарушение ионного гомеостаза.

Несмотря на разную природу повреждающих факторов, при некрозе выделен ряд общих с апоптозом биохимических каскадов. Среди них:

- нарушение окислительного фосфорилирования (синтеза АТФ) и гликолиза;
- нарушение внутриклеточного баланса Ca^{2+} (его накопление);
- увеличение проницаемости плазматической мембраны и мембран внутриклеточных органелл;
- генерация АФК и свободных радикалов;
- необратимое разрушение митохондрий;
- повреждение ядра клетки с активацией эндонуклеаз и деполимеризацией (дезинтеграцией) ДНК и РНК.

Рассмотрим на примере разрушения митохондрий значение некоторых из этих каскадов биохимических реакций. Именно степень разрушения митохондрий определяет возможность выживания клетки и путь ее гибели (апоптоз или некроз).

Известно, что митохондрии нормальной клетки служат источником АФК, допустимый уровень которых поддерживается защитной ферментной системой, включающей цитохромоксидазу, супероксиддисмутазу, глутатионпероксидазу (см. главу 11).

В поврежденной клетке концентрация АФК нарастает, что ведет к открытию транзитных пор с выходом в цитоплазму цитохрома-с и АФК, что сдерживает их дальнейшую генерацию.

Если транзитные поры остаются открытыми (и при этом сохраняется избыток АФК), то наступает гибель митохондрий или так называемый митоптоз, ведущий либо к апоптозу (за счет цитохрома-с и AIF), либо к некрозу (при нехватке АТФ).

Клинические проявления некроза отличаются выраженным полиморфизмом, в основе которого лежат «местная смерть» группы соседних клеток и выключение из функционирования жизненно важных клеточных зон. Таковы, например, причины инфарктов миокарда, ишемии головного мозга, некрозов коркового вещества почек, прогрессирующего некроза печени и острого панкреатита, осложненного панкреонекрозом.

Следовательно, некроз, являясь результатом непрограммированных, но биохимически, морфологически и клинически максимально выраженных деструктивных процессов в клетке, вносит существенный вклад в патогенез многих заболеваний.

Обратимость и необратимость повреждений при некрозе

Повреждение митохондрий при некрозе может быть обратимым в случае нерезко выраженного радиационного воздействия (включая УФО). При этом обратимым считается само явление формирования транзитных пор.

Возможна обратимость повреждений целых клеток, но только на начальных этапах.

Обратимая стадия - это, *во-первых*, неспецифическая реакция в ответ на любое раздражение клетки. Для нее характерны:

- увеличение проницаемости мембран для ионов Ca^{2+} и последующая активизация гидролаз с развитием метаболических нарушений;
- изменение состава липидов и микровязкости фосфолипидного бислоя мембран;
- возрастание доли холестерина при атеросклерозе и старении;
- частично компенсируемые процессы ПОЛ при сахарном диабете (см. главу 9).

Во-вторых, обратимость повреждений наблюдается при ишемии миокарда с последующей реперфузией. Всего два фактора обуславливают необратимость повреждений при ишемии - это дисфункция митохондрий клетки с резким дефицитом АТФ и дисфункция клеточных мембран.

Вместе с тем, в настоящее время не определены критерии перехода поврежденной клетки из обратимого состояния к необратимому.

ГЛАВА 11 ЗАЩИТНЫЕ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ КЛЕТКИ

Общие данные

Как сказано в главе 6, клеточные мембраны в условиях нормального функционирования обеспечивают множество функций. Плазматическая и внутриклеточные мембраны либо функционируют самостоятельно - в основном за счет интегральных белков, находящихся по обе стороны мембраны, либо участвуют в сопряженных с ними функциях клетки (за счет контроля со стороны рецепторных и транспортных белков), а также функциях структурных компонентов клетки, сформированных из других белков, липидов, сахаров и микроэлементов.

В целом повреждения клетки сопровождаются нарушениями происходящих в ней генетических, биохимических и физико-химических процессов и связаны с преобразованиями макро- и микромолекул, включая: полинуклеотиды и нуклеотиды, полипептиды и пептиды, полисахариды и моносахариды, липиды и их компоненты (фосфолипиды, сфинголипиды, жирные кислоты, холестерин), а также перемещениями ионов металлов и других химических соединений, свободных радикалов, электронов, атомных и аттомолярных структур.

Именно поэтому столь велико значение для клетки ее защитных и восстановительных (репарационных) ферментных систем при разного рода повреждениях. Рассмотрим эти системы с учетом приведенных в предыдущих главах пособия данных о структурной организации, причинах и механизмах повреждения клетки, а также данных об основных формах клеточной гибели.

ЗАЩИТНЫЕ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА

Как известно, к главным защитным и восстановительным системам организма относятся нервная, эндокринная и иммунная системы (см. главы 13-15). Затем (по значимости) следуют детоксицирующие системы внутренних органов (печень, селезенка, почки),

тканей (кожа и слизистые оболочки) и, наконец, клеточные защитные и восстановительные системы, включая: системы цитохрома P₄₅₀, глутатионзависимых ферментов, супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, плазмалогенов, пероксидаз и фосфолипаз (в частности, фосфолипидные) и другие системы, связанные с восстановлением структурообразующих компонентов клетки. Отдельного внимания заслуживают многочисленные системы репарации ДНК и пока еще мало изученные ферментные защитные системы биологических жидкостей организма (крови, лимфы, церебральной жидкости, желудочного и кишечного сока). Все эти защитные и восстановительные системы организма основаны на действии генов, объединенных в единые генные сети (см. главу 2).

В первую очередь рассмотрим наиболее известные защитные системы клетки.

Системы детоксикации ксенобиотиков

Системы инактивации (детоксикации) чужеродных для организма веществ или ксенобиотиков, контролируются генами внешней среды, кодирующими синтез многочисленных белков-ферментов, метаболизирующих (деградирующих и детоксицирующих) и выводящих из организма ксенобиотики.

Мутации генов детоксикации нередко обуславливают наследственную предрасположенность к тяжелым заболеваниям, поражающим различные системы организма и отдельные органы. Например, хорошо изучена связь клинических проявлений муковисцидоза, обусловленного мажорной мутацией (CFTR), с состоянием генов системы детоксикации. Основными проявлениями этого заболевания являются тяжелые хронические обтурационные пневмонии, приводящие к преждевременной смерти больных детей, как правило, не доживающих до двадцатилетнего возраста. В свою очередь, мутации самих генов детоксикации нередко предрасполагают к развитию заболеваний легких: бронхиальной астмы, хронического обтурационного бронхита, рака, эмфиземы и другой легочной патологии.

Было также высказано предположение, что и аллельные варианты генов детоксикации могут влиять на клинические проявления при муковисцидозе. Это предположение было подтверждено в работе М.А. Бакай и соавт. (1999). Оказалось, что больные со смешанной формой и тяжелым течением муковисцидоза либо были гомозиготами по «нулевому» аллелю гена глутатионтрансферазы M1 (GSTM1 0/0) -

ферменту второй фазы детоксикации ксенобиотиков, либо имели медленно экспрессирующийся S-аллель гена первой фазы детоксикации - микросомальной эпоксигидролазы (mEPXH).

В этой работе было также отмечено достоверное преобладание гомозиготного состояния по аллелю S (или S/S) в гене mEPXH у больных с хроническими респираторными заболеваниями.

Учитывая четкую корреляцию легочной патологии с «медленным» аллелем гена mEPXH и «нулевым» аллелем гена GSTM1, сделали вывод, что у больных с муковисцидозом, связанным с соответствующим распределением аллелей (mEPXH S/S и GSTM1), легочная патология развивается наиболее часто и протекает особенно неблагоприятно. По этой причине авторы посчитали целесообразным выяснение не только характера мутации в гене муковисцидоза, но и определение у больных случаев носительства неблагоприятных

аллелей генов mEPXH S/S и GSTM1. Иными словами, в этой работе показано четкое влияние некоторых аллелей генов DQA1 локуса HLA на тяжесть течения муковисцидоза и хронических респираторных заболеваний.

Детоксикация с помощью цитохрома P₄₅₀

В мембранах ЭР клеток печени, а также других органов и тканей находятся монооксидазные ферментные системы, обеспечивающие биосинтетические и дезинтоксикационные процессы по нейтрализации (трансформации) ксенобиотиков (лекарств и техногенных соединений - прокарциногенов) в первой фазе детоксикации. Эти системы сформированы из гиперсемейств цитохромов P₄₅₀ или монооксигеназ, которые метаболизируют широкий спектр экзогенных и эндогенных субстратов.

По состоянию на январь 2006 г., в геномах человека и животных было идентифицировано 1174 белка и соответствующее количество кодирующих их генов, относящихся к цитохромам P₄₅₀ (Лисица А.В., 2007). При этом количество известных химических соединений, взаимодействующих с ферментами системы цитохрома P₄₅₀, насчитывало 1708, включая 1223 субстрата, 115 индукторов и 484 ингибитора.

В организме человека выделено около 50 форм цитохромов P₄₅₀ (Helson, 1998), участвующих в реакции монооксигеназного катализа и играющих в ней ведущую роль благодаря способности избирательно связываться с субстратом. Функционирование цитохромов P₄₅₀ определяется их взаимодействием с белками-партнерами. Ферменты цитохрома P₄₅₀ замыкают цепочку переноса электронов и используют полученные редокс-эквиваленты для окисления субстрата. В каче-

стве белков-партнеров цитохрома P₄₅₀ могут быть либо несколько белков, например НАДФН-цитохром P₄₅₀-редуктаза и цитохром B5, а также адренодоксин-редуктаза и адренодоксин, либо это может быть только один белок, например редуктаза.

В числе генов человека, кодирующих ферменты цитохрома P₄₅₀, был выделен ген ароматазы CYP19, ответственный за синтез фермента, катализирующего переход андрогенов в эстрогены в разных тканях, включая ткань грудной железы. Этот ген имеет 11 полиморфизмов ДНК, связанных с усилением или ослаблением его экспрессии (аллели: TTТА₇, TTТА₁₁ TTТА₁₂ и др).

Другой ген этой системы - ген CYP1A1 кодирует цитохром P₄₅₀1A1, который метаболизирует углеводороды табачного дыма и также имеет свои полиморфизмы (T623C, A4489G).

Ген CYP17 кодирует цитохром P₄₅₀c17альфа. Он участвует в биосинтезе половых стероидов.

Следует отметить, что локализация цитохромов P₄₅₀ в микросомах печени обеспечивает получение ими электронов от белкафлавопротеина (цитохром P₄₅₀-редуктаза), а сами цитохромы P₄₅₀ являются активной формой белка-гемопротеина. При этом стабильность данного белка обеспечивается липидным бислоем мембраны, состоящим из фосфатидилхолина или смеси микросомальных фосфолипидов.

Установлено, что при взаимодействии цитохрома P₄₅₀ с ксенобиотиком происходит его инактивация, в ходе которой он переходит из активной формы цитохрома P₄₂₀ в неактивную. Кроме того, данная неактивная форма может быть получена при инкубации изолированных микросом печени при температуре 37 °С.

В реакциях «ксенобиотик-цитохром P₄₅₀» все ксенобиотики выступают в роли либо экзогенных субстратов (канцерогены, лекарства, пищевые добавки, токсины, яды), либо эндогенных субстратов (жирные кислоты, простагландины, стероиды, холестерин). Молекулы этих субстратов связываются в мембранах ЭР с молекулами цитохрома P₄₅₀, вызывают цепь реакций ПОЛ и другие изменения. При этом они могут действовать как прямо, так и опосредованно. Во втором случае среди них выделяют облигатные и факультативные ксенобиотики.

Облигатные ксенобиотики, например фенobarбитал, оказывают прямое токсическое действие на гепатоциты (эффект зависит от дозы), что ведет к гепатомегалии за счет индукции печеночных ферментов.

В свою очередь, ксенобиотик кортизон вызывает жировую инфильтрацию печени или стеатоз в результате трансформации в высокотоксичные промежуточные соединения, например салицилаты и полициклические углеводороды.

Кроме того, прямое действие облигатных ксенобиотиков или их метаболитов вызывает нарушение обмена билирубина (на всех этапах его синтеза от гема до экскреции в желчные протоки), дилатацию синусоидов и окклюзию вен печени, что ведет к некрозу и реже к апоптозу клеток печени.

Факультативные ксенобиотики вызывают иммуно-опосредованные реакции, лежащие в основе идиосинкразии или непереносимости соединений, например аллергические реакции на лекарства.

Молекула самого цитохрома P₄₅₀ поражается за счет двух механизмов повреждения: непосредственно белка свободными радикалами и липидного окружения белка в мембране.

В целом механизм детоксикации ксенобиотиков в печени с участием цитохрома P₄₅₀ включает три фазы.

- *Первая фаза* - контакт ксенобиотика с ферментами ЭР (микросомальная фракция гепатоцитов), монооксигеназами, цитохром с-редуктазами, восстановленным НАДФ (в качестве кофактора) и цитохромом P₄₅₀. Во время контакта происходит модификация ксенобиотика с формированием (освобождением) функциональных групп.
- *Вторая фаза* - биотрансформация или конъюгация (соединение) молекулы ксенобиотика с эндогенными молекулами при участии двух ферментов: UDP-глюкуронилтрансферазы и глутатион-S- трансферазы, обеспечивающих детоксикацию или снижение токсичности с ускоренным выведением ксенобиотика (см. ниже). В этой фазе микросомальная глутатион⁻-трансфераза непосредственно связана с молекулой цитохрома P₄₅₀, что способствует быстрой инактивации промежуточных продуктов метаболизма или реакционных метаболитов ксенобиотика.
- *Третья фаза* - активный транспорт и экскреция (эвакуация) трансформированных с помощью цитохрома P₄₅₀ продуктов ксенобиотика с желчью и мочой.

Таким образом, инактивация цитохрома P₄₅₀ - это показатель повреждения мембран ЭР в печени. Вместе с тем, по скорости инактивации цитохрома P₄₅₀ можно судить о восстановлении или репарации поврежденных мембран клетки.

Детоксикация гидроперекисей фосфолипидов

К системе детоксикации гидроперекисей фосфолипидов (LOOH) относятся три глутатионзависимых комплекса ферментов, осуществляющих двухэлектронное

восстановление LOOH: глутатионпероксидаза, фосфолипид-пероксид-глутатион-пероксидаза, а также селенсодержащая глутатион-трансфераза, тип альфа (-SH-S-) или GST-комплекс. Эти ферментные комплексы относятся к антиоксидантам - хинолам (енолам), присутствуют во всех клетках, тканях и органах, осуществляют взаимодействие с витаминами E, C и убихинолом (кофермент Q) и являются универсальными системами для связывания активных метаболитов. Все три глутатионзависимые антиоксидантные системы относятся к ферментной редокс-системе глутатиона (ФРСГ), которая участвует в ПОЛ и пролиферации иммунокомпетентных клеток. ФРСГ контролирует деление и активность прооксидантов, угнетает свободно-радикальные стадии перекисного окисления, разрушает (нерадикальным путем) перекиси и взаимодействует с неперекисными продуктами перекисного окисления.

Свойства редокс-системы определяются состоянием баланса: «окисление-восстановление» (см. главу 9).

Уровень активности глутатионзависимых ферментов в разных клетках и тканях отражает состояние всей антиоксидантной системы, так как эти ферменты необходимы для защиты от агрессии АФК, цепных свободно-радикальных реакций и усиления процессов ПОЛ.

Индукция глутатионзависимых ферментов характеризуется «избыточностью» их активности и сбалансированностью по отношению к оксигенации клеток, тканей и органов.

Особая роль принадлежит GST-комплексу, включающему 21 фермент, из которых истинно цитозольными являются 16. Они сгруппированы в 6 подсемейств (классов): альфа, мю, омега, пи, тета и дзета. Каждый класс - это димер, состоящий из двух равных или разных субъединиц (с собственными активными центрами), которые действуют независимо друг от друга. В каждой субъединице 2 домена, связанных короткой линкерной цепочкой из 6 аминокислотных остатков.

Каждый из шести классов ферментов кодируется кластерами генов.

- Класс альфа - кластер генов расположен в локусе 6p12, содержащем гены GSTA1, GSTA2, GSTA3, GSTA4 и GSTA5 и 7 псевдогенов.

Гены этого класса участвуют в обмене билирубина, гема и стероидных гормонов. Гены GSTA1 и GSTA2 экспрессируются во всех тканях. Ген GSTA3 выделен из 8-9-недельной плаценты. Ген GSTA5 из тканей не выделен.

- Класс мю - кластер картирован в локусе 1p13.3. Включает 5 генов: ген GSTM1 (представлен тремя аллельными вариантами: A, B и O; экспрессируется в клетках печени и крови); ген GSTM2 (только в мышцах); гены GSTM3 и GSTM4 (тестикулы и мозг); ген GSTM5 (легкие, мозг, сердце, тестикулы), а также 2 псевдогена.

- Класс омега - кластер состоит из двух генов, картированных в локусе 10q25.1. Из них ген GSTO1 кодирует уникальный фермент «домашнего хозяйства», удаляющий S-тиоловые радикалы, образующиеся в ответ на оксидантный стресс. Второй ген - это GSTO2 (мало изучен). Транскрипты этих генов широко представлены во всех тканях. Максимальная их экспрессия наблюдается в печени, скелетных мышцах и сердце; минимальная экспрессия характерна для легких, мозга и плаценты.

- Класс пи - представлен одним геном GSTP1, картированным в локусе 11q13, и псевдогеном GSTPP, картированным в локусе 12q13-q14. Ген GSTP1 имеет 3 аллельных варианта, связанных с полиморфизмом нуклеотидных последовательностей в кодонах 105

и 114, относящихся к активным центрам ферментов. Этот ген является ингибитором протеинкиназ, участвующих в клеточной пролиферации и апоптозе.

- Класс тета - его кластер включает 2 гена (GSTT1 и GSTT2), картированных в локусе 22q11.23. Ген GSTT1 существует в двух аллельных вариантах (активном и нулевом). Ген GSTT2 мало изучен.

- Класс дзета - представлен одним геном GSTZ1, картированным в локусе 14q24.3. Ген экспрессируется в клетках печени и в меньшей степени - в клетках скелетных мышц и тканей мозга. Участвует в обмене фенилаланина и тирозина.

Следует отметить, что ферменты GST-комплекса, синтезируемые всеми указанными классами генов, функционируют на основе многочисленных механизмов, среди которых:

- каталитическая инактивация ксенобиотика через его соединение с глутатионом или путь замещения по электрофильным атомам углерода (галоген и нитроалканы), азота (тринитроглицерин), серы (тиоцианаты и дисульфиты) и фосфора (метилпаратионин);
- некаталитическая конъюгация (связывание) с субстратом; классическим субстратом считается 1-хлоро-2,4-динитробензол; этот путь также характерен для конъюгации оксиаренов, эпоксидов алкенов, ионов нитрония и карбония, а также свободных радикалов;
- восстановление органических гидроперекисей (липид- и ДНКгидропероксиды) до спиртов через экспрессию активности GSH-пероксидазы или восстановленного глутамина;
- изомеризация простагландинов и стероидов;
- участие в метаболизме других экзогенных соединений.

Восстановленный глутатион (GSH) относится к низкомолекулярным тиолам, доминирующим в большинстве пролиферирующих клеток. Этот трипептид (L-гамма-глутамил-L-цистеинилглицин) участвует в глутамильном цикле и обезвреживает различные токсические соединения путем их преобразования в тиоэфиры (при этом атакуются атомы азота, кислорода, серы и углерода). В ходе дальнейшего метаболизма глутатионовые конъюгаты переходят в меркаптуровые кислоты (меркаптаны) и выводятся из организма (со скоростью около 0,1 ммоль в сутки).

Значение GSH можно проследить у онкологических больных, у которых концентрация свободного глутамина зависит от свойств цитостатиков, которые истощают его запас, вызывая лизис опухолевых клеток. Кроме того, при пролиферации клеток и опухолевом росте снижение концентрации тиолов и дисульфитов зависит от поддержания баланса метаболизма, синтеза глутатионзависимых ферментов и удаления гидроперекисей фосфолипидов.

Детоксикация LOOH протекает по схемам, предусматривающим действие:

- пероксид- Ca^{2+} -стимулируемой PLA₂ и глутатион-пероксидазы по пути «гидролиз-восстановление-репарация»;
- ФЛ-пероксид-глутатион-пероксидазы и фосфолипазы A₂ по пути «восстановление-гидролиз-репарация».

Обе схемы ведут к реакцированию лизофосфолипидов.

Вместе с тем, в условиях дисбаланса между эндогенными оксидантами и антиоксидантами может возникнуть избыток АФК и последующий за ним окислительный стресс. Механизм такого стресса, именуемого «окислительно-стрессорным сигналингом», сопровождается реакции ПОЛ в ответ на угрожающе высокий или низкий уровень оксидантов.

Окислительно-стрессорный сигналинг

С помощью окислительно-стрессорного сигналинга (ОСС) клетка продуцирует избыток антиоксидантов и активирует один или сразу несколько классов ферментов: восстановленный глутатион (см. выше), гемоксигеназу-1, глутатионпероксидазу, каталазу, СОД и ферритин.

уровень последних поддерживается защитной ферментной системой, включающей наряду с СОД еще и цитохромоксидазу, глутатионпероксидазу и некоторые другие ферменты.

Антиоксидантная роль крови

Как отмечено в главах 8 и 9, в регуляции активности мембранных ферментов важную роль играют механизмы сигнализации. Большая часть этих механизмов реализуется через кровь, которая обладает собственной антиоксидантной активностью и непосредственно контактирует со структурными компонентами стенок кровеносных сосудов, в основном представленных эндотелиальными клетками.

Регуляцию активности ферментов с помощью структурнофункциональных элементов крови можно продемонстрировать на примере «тканевого фактора», или трансмембранного гликопротеина, обнаруженного при атеросклерозе в адвентиции кровеносных сосудов и внутренней области атеросклеротической бляшки. Этот фактор экспрессируется на мембранах моноцитов и макрофагов и участвует в воспалении и дестабилизации бляшки; он особенно чувствителен к действию ингибиторов, синтезируемых эндотелиальными клетками кровеносных сосудов в ходе сигнализации.

Важно отметить, что через кровь транспортируется кислород, осуществляется бактерицидное действие фагоцитов, перемещаются ионы металлов переменной валентности, являющиеся катализаторами или ингибиторами процессов окисления-восстановления. Вместе с тем, кровь в определенной мере является лимитирующим звеном системы антиоксидантной защиты, так как по сравнению с внутриклеточным содержимым в ней мало высокомолекулярных антиоксидантов, что способствует усилению окислительных реакций и не благоприятствует восстановительным реакциям.

Механизмы восстановления клеточных мембран

Биохимики давно высказано предположение об адаптации клеточных мембран к повреждениям. В пользу этого, например, свидетельствуют данные о восстановительной работе ферментов за счет реакций, осуществляемых ПК С, МАРК и митохондриальными АТР-зависимыми кальциевыми каналами. В частности, открытие кальциевых каналов в мембранах митохондрий вызывает их деполяризацию, снижая избыточное накопление Ca^{2+} .

Именно такой механизм способствует регенерации клеток при инфаркте миокарда.

Экспериментальным путем показано восстановление активности ферментов *in vitro* поврежденных мембран микросом в печени крыс при добавлении к ним ФХ или смеси ФХ и лизоФХ. Добавление этих фосфолипидов восстанавливало активность

глюкозо-6-фосфатазы, Ca^{2+} -, Na^{+} -, K^{+} -АТФазы, стеароил-КоА-десатуразы, липазы, UDP-глюкуронилтрансферазы, фенилаланингидроксилазы, цитохром B5 -редуктазы.

Схожие результаты были получены для сфингомиелиназ мозга, бета-оксибутиратдегидрогеназы митохондрий сердца и ацетилхолинэстеразы эритроцитов быка.

В связи с этими данными было предположено, что восстановление фосфолипидами активности мембранных белков носит неспецифический характер, так как у большинства ферментов нет потребности в определенных типах фосфолипидов, и поэтому восстановительную функцию могут выполнять для них разные типы последних (или их смеси).

Интересен уже сам факт участия мембранных фосфолипидов в восстановлении активности белков-ферментов. Вместе с тем, для сохранения (а возможно, и для восстановления) активности мембранных ферментов важным является жирнокислотный состав фосфолипидов, добавляемых в клетки. Например, это было показано для Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума, когда замена собственных фосфолипидов на ДПФХ (фосфатидилхолин с высоким содержанием насыщенных жирных кислот) в 8 раз снижала активность по сравнению с частично делипидированным ферментом, а при замене собственных фосфолипидов на диолеил-ФХ скорость реакции, наоборот, резко возрастала.

Кроме того, отмечено значение высокой подвижности углеводородных цепей фосфолипидов для восстановления активности ферментов и наличия на мембранах определенного поверхностного заряда.

Схожие результаты были получены в отношении:

- кислых фосфолипидов (ФС, ФИ и ФК) при их действии на фосфатазу миозина гортани;
- анионных фосфолипидов (ФС) - при действии на 5-монодегидрогеназу плаценты человека.

Таким образом, в настоящее время можно говорить о бесконечном многообразии и значении еще не открытых, но, по-видимому, реально существующих механизмов восстановления структурных и функциональных нарушений клеточных мембран.

Ингибиторы мутагенеза

Как сказано в главе 5, мутагенез - это процесс образования мутаций в наследственном материале, индуцированный действием различных мутагенных факторов.

Еще в середине XX в. А. Новик и Л. Сцилард показали, что апуриновые рибонуклеозиды снижают уровень спонтанных и индуцированных мутаций у *E. coli*, что позволило им выделить новый класс химических соединений, получивших название антимутагенов.

В конце XX в. С де Флора и С. Рэмел разделили антимутагены на два класса: внеклеточные (дисмутагены) и внутриклеточные.

Внеклеточные антимутагены включают три подгруппы.

- Ингибиторы поглощения антимутагенов и их предшественников (ароматические аминокислоты, жирные кислоты и др.). Они препятствуют проникновению и ускоряют выведение из организма мутагенов.

- Ингибиторы эндогенного формирования мутагенов (аскорбиновая кислота, токоферол, фенолы, ферментированные молочные продукты). Они предотвращают или тормозят реакции нитрозирования или изменяют внутрикишечную флору.
- Дезактиваторы мутагенов в результате физических и/или химических реакций (антиоксиданты, вещества, поддерживающие уровень pH в биологических жидкостях, и тиолы).

Внутриклеточные антимутагены также включают три подгруппы.

- Модуляторы метаболизма (тиолы и фенолы). Они ускоряют переход мутагенов в клетки, не являющиеся мишенями, и индуцируют механизм детоксикации.
- Инактиваторы реакционноспособных молекул. Они взаимодействуют с электрофилами, защищают нуклеофильные участки ДНК, улавливают кислородные радикалы.
- Модуляторы репликации и репарации ДНК (арсенит натрия, ванилин, ингибиторы протеаз, кумарин, тиолы, хлорид кобальта). Они увеличивают точность репликации, повышают эффективность репарации, ингибируют ошибки репарации.

Как следует из этой классификации, одно и то же соединение может относиться к нескольким группам, например тиолы.

Помимо внеклеточных и внутриклеточных антимутагенов, Б. Ставрик выделил в 1992 г. из разных типов пищевых продуктов более 25 содержащихся в них антимутагенов или химиопревенторов. В эту группу вошли витамины, жирные кислоты, кальций, кароти-

ноиды, кумарины, пищевые волокна, растительные кислоты, селен, флавоноиды и хлорофилл.

К антимутагенам растительного происхождения относятся зеленый перец, капуста, листья мяты, лук, семена растений, яблоки.

Действие антимутагенов специфично: оно проявляется с высокой избирательностью и зависит от дозы. При этом одни антимутагены могут быть ингибиторами мутагенов, оказывать противоположное комутагенное действие, либо их действие может вообще не проявиться. В частности, к таким антимутагенам относятся витамины С,

В₂ и Е.

Не исключена возможность защиты с помощью антимутагенов клеток одних тканей с одновременным потенцированием мутагенных эффектов в клетках других тканей.

В целом вопрос об эффективности экзогенных и эндогенных корректоров мутагенеза до сих пор остается открытым.

В связи с этим перейдем к рассмотрению более известных и широко обсуждаемых в научной и учебной литературе восстановительных механизмов в поврежденной клетке.

Восстановление структуры ДНК с помощью механизмов репарации

Как известно, клетки обладают восстановительной способностью или способностью исправлять и устранять (репарировать) повреждения молекулы ДНК, восстанавливая ее исходную структуру. Благодаря этому лишь ограниченное число мутаций сохраняется в процессе репликации, транскрипции и трансляции.

Вместе с тем, если мутация не распознана, извращенная информация транскрибируется в мРНК и экспрессируется в форме неполноценного протеина. Последствия такого события для клетки часто бывают несущественными, но иногда они крайне нежелательны, и это зависит от функций, выполняемых неполноценным протеином.

В настоящее время хорошо изучены многочисленные репарационные механизмы как известные со времен классической генетики (фотореактивация, репарация тиминовых димеров; эксцизионная репарация; SOS-репарация), так и открытые в последние годы (см. ниже).

Обобщив особенности этих механизмов, можно заключить, что репарация разного рода повреждений в молекуле ДНК идет в несколько этапов:

- *первый этап* - это идентификация повреждения и определение его типа;
- *второй этап* - это активация ферментов, которые или напрямую преобразуют повреждение до исходного состояния, или (если прямое восстановление невозможно) вырезают поврежденный участок, формируя брешь.

В последнем случае прибавляются еще два этапа:

- *третий этап* - это синтез нового участка молекулы ДНК (взамен поврежденного);
- *четвертый этап* - это встраивание нового участка в брешь.

Фотореактивация или репарация тиминовых димеров

Под действием УФО в молекуле ДНК может произойти ковалентное сшивание двух рядом стоящих пиримидинов (двух тиминов), находящихся в разных нитях молекулы. При этом образуются тиминовые димеры (циклобутановое кольцо), блокирующие репликацию ДНК. В ходе репарации тиминовых димеров «узнающий» их фермент - фотолиаза соединяется с ними, образуя единый комплекс. УФО активирует этот фермент, и циклобутановое кольцо разрывается с образованием двух отдельно стоящих тиминов. Данный механизм А. Кельнер в 1949 г. назвал фотореактивацией.

Дезаминирование (метилирование) и репарация ошибочно спаренных оснований

Как сказано в главе 6, в ходе дезаминирования аденин превращается в гипоксантин, который образует водородные связи с цитозином. Гуанин преобразуется в ксантин, который образует водородные связи с тиминном. Тимин не может быть дезаминирован (единственное азотистое основание в ДНК). При метаболизме цитозина образуется урацил. Если процессы дезаминирования этих азотистых оснований нарушаются, в молекуле ДНК появляются ошибочно или неправильно спаренные основания. Так, вместо АТ-пар в цепи ДНК образуются ГТ-пары, а вместо ГЦ-пар образуются ГА-пары - это ошибки спаривания. Они устраняются с помощью двух механизмов: *ГТ-мismatch-репарации* и *ГА-mismatch-репарации* соответственно. Участниками этих механизмов репарации могут быть:

- белковые продукты четырех генов семейства Mut: H, L, S и U;
- белки-хеликазы;
- ДНК-полимеразы, обладающие свойством «делать шаг назад» после постановки очередного нуклеотида в растущую нить ДНК и вырезать последний нуклеотид, если он некомплементарен нуклеотиду в матричной цепи ДНК, т.е. способные корректиро-

вать ошибки спаривания;

- аденозинтрифосфатазы (АТФ);
- дезоксинуклеотидфосфатазы (dNTP).

Следует отметить, что механизмы мисмэтч-репарации оперируют на дочерней нити и производят замену некомплементарных оснований только в ней.

Вскоре после окончания репликации ферменты-метилазы присоединяют метильные группы к аденинам в последовательностях ГАТЦ (гуанин-аденин-тимин-цитозин).

Во время следующей репликации нити ДНК оказываются различимыми: материнская нить содержит метилированные аденины, а в дочерних нитях до окончания репликации аденины еще не метилированы. Их метилирование начнется только после окончания репликации. Поэтому пока аденины не метилированы, клетки должны успеть «отрепарировать» мисмэтчи. Репарация неправильно спаренных оснований может происходить в ходе дезаминирования ДНК, когда фермент N-гликозилаза узнает такое основание, разрывает ковалентную N-гликозидную связь и удаляет его. Кроме того, мисмэтч-репарация может проводиться в ходе метилирования ДНК (см. главу 7).

Если образование классических «уотсон-криковских» пар оснований вообще затруднено, то во время репликации могут происходить ошибки спаривания (ошибки репликации) и также возникают мисмэтчи. Для их устранения привлекаются уже другие ферменты: сначала эндонуклеаза разрывает одну цепь ДНК в местах, где не успели сформироваться АТили ГЦ-пары, затем фосфодиэстераза отщепляет в этих местах разрывов те сахаро-фосфатные группы (АП-сайты), к которым не присоединены основания. Появившиеся в цепочке молекулы бреши (размером в один нуклеотид) застраиваются ДНК-полимеразой I, после чего фермент-лигаза сшивает концы ДНК, восстанавливая исходное состояние молекулы.

Алкилирование и репарация O^6 -алкилированного (метилированного) гуанина и O^4 -алкилированного тимина

Алкилирование - это добавление алкильных боковых групп (метилвые, этиловые, пропиловые или бутиловые) в пуриновые или пиримидиновые основания молекулы ДНК под действием ряда химических мутагенов (алкилирующих агентов). Например, метилнитрозо-гуанит алкилирует (метилирует) гуанин, присоединяя к нему метиловую группу.

В ходе *репарации O^6 -алкилированного гуанина* (O^6 меГ) метиловая группа отщепляется от гуанина благодаря кислороду, связанному с шестым атомом, и в этой точке происходит восстановление структуры ДНК. Этот механизм был открыт И.А. Рапопортом в 1944 г.

Как установлено, в ходе алкилирования в клетках синтезируются белки - метилтрансферазы, которые захватывают у модифицированного гуанина его метиловые группы, восстанавливая исходную структуру ДНК. Причем метилтрансферазы, захватившие такие группы, уже не могут от них избавиться, что свидетельствует о том, что они не относятся к классу ферментов, которые не изменяются в ходе многочисленных реакций. Кроме этого механизма выделена *репарация O^4 -алкилированного тимина* (O^4 -алТ). Следовательно, если допустить, что для каждого акта прямой репарации ДНК нужны новые белковые молекулы, то в случае повреждения алкилирующими агентами клетка вынуждена организовать их синтез в соотношении: одна молекула на одно повреждение. Поэтому процессы образования повреждений ДНК и их репарации взаимосвязаны. Как правило, внутри клетки накапливаются тысячи таких молекул. Например, за один

клеточный цикл, протекающий у кишечной палочки в течение 30 мин, может накопиться около 3000 метилтрансфераз, способных нейтрализовать 3000 повреждений ДНК.

Апуринизация и эксцизионная репарация

Апуринизация - это образование АП-сайтов в нуклеотидной цепи

ДНК.

Как известно, каждая соматическая клетка при функционировании теряет за сутки примерно 10 тыс. пуринов и пиримидинов, и в результате в ее молекуле ДНК образуются апуриновые сайты или сахарофосфатные группы без оснований (АП-сайты). Если бы АП-сайты не исправлялись, то произошла бы катастрофа.

В ходе устранения АП-сайтов ферменты-инсеразы разрывают ковалентную N-гликозидную связь между основанием и дезоксирибозой, и после этого осуществляется прямая вставка пуринов. Этот механизм открыт Т. Линдалом в 1979 г.

Причины апуринизации: повышение температуры, изменение pH, ионизирующее излучение.

Если клетка не справляется с повреждениями оснований и нуклеотидов в молекуле ДНК с помощью перечисленных выше восстановительных механизмов, тогда в дело вступают более сложные механизмы репарации, одним из которых служит эксцизионная репарация,

осуществляемая путем вырезания (эксцизии) поврежденного основания в нуклеотиде или более протяженного участка молекулы.

Эксцизионная репарация поврежденных оснований происходит с помощью ДНК-гликозилаз, которые узнают повреждения оснований, возникающие при метилировании, окислении, восстановлении, дезаминировании, присоединении формидных групп и других реакциях.

Семейство ДНК-гликозилаз включает 11 типов ферментов, соединяющихся с субстратами или поврежденными мишенями: uga- (содержит урацил); hmu-(оксиметилурацил); 5-tC- (метилцитозин); Hx-(гипоксантин); 3ntA-, тип I (3-метиладенин) и тип II (содержит метиладенин, 7-метилгуанин или 3-метилгуанин); FaPy-(остатки формидопиримидинов или 8-оксигуанина); 5, 6-НТ или эндонуклеаза III (5,6 гидратированные остатки тимина); PD-(димеры пиримидинов); тиминовый мисмэтч (содержит некомплементарную ГТ-пару оснований); субстрат mutY (содержит некомплементарную ГА-пару).

ДНК-гликозилазы присоединяются к повреждениям, рвут гликозидные связи между модифицированным основанием и дезоксирибозой, за счет чего образуются АП-сайты.

Образовавшиеся АП-сайты распознаются ферментом АП-эндонуклеазой (способна разорвать цепь внутри молекулы ДНК или РНК). После появления разрыва вступает в действие фермент фосфодиэстераза, которая отщепляет от ДНК ту сахарофосфатную группу, к которой уже не присоединено основание.

В результате появляется брешь в одной цепи ДНК размером в один нуклеотид. Напротив бреши в противоположной цепи ДНК расположен неповрежденный нуклеотид, и уже другой фермент (ДНКполимераза I) вставляет в брешь комплементарный ему нуклеотид, присоединяя его к свободному 3' ОН-концу. Этот конец нити ДНК и ранее образовавшийся при разрыве нити 5'-конец соединяются между собой под действием полинуклеотидлигазы. После этого вся структура считается полностью восстановленной: удалено неправильное основание, вырезан сахарофосфат, к которому было присоединено

это основание, брешь заполнена правильным нуклеотидом и одонитевой разрыв восстановлен.

Эксцизионная репарация поврежденных нуклеотидов

Механизм эксцизионной репарации является более сложным и более энергозатратным механизмом, связанным с вырезанием не просто поврежденного основания, а значительного участка цепи

ДНК перед повреждением и после него. У кишечной палочки такую репарацию осуществляет мультиферментный комплекс из эндонуклеаз, кодируемых тремя генами ультрафиолетовой репарации или генами *uvr* (А, В и С) и называемый комплексом - эксцинуклеаза (рис. 50). Этот механизм был описан Р. Сетлоу и В.Н. Сойфером в 1970 г. Он включает следующие этапы:

- распознавание повреждения белками *uvr* А и В;
- изгиб молекулы ДНК и изменение конформации белка *uvr* В;
- внесение двух одонитевых надрезов ДНК с обеих сторон от повреждения с помощью белков *uvr* В и С;
- расплетение ДНК в участке между двумя надрезами с помощью белка *uvr* D (хеликаза II);
- отсоединение содержащего дефект фрагмента длиной 12 нуклеотидов (12-мер) с образованием брешы, при этом расходуется энергия одной молекулы АТФ;
- застройка образовавшейся брешы с помощью ДНК-полимеразы;
- соединение свободных концов сахарофосфатного остова ДНК с помощью ДНК-лигазы.

Аналогичный механизм существует у человека. Вместе с тем, у него комплекс эксцинуклеазы состоит из 17 белков, застройка брешы

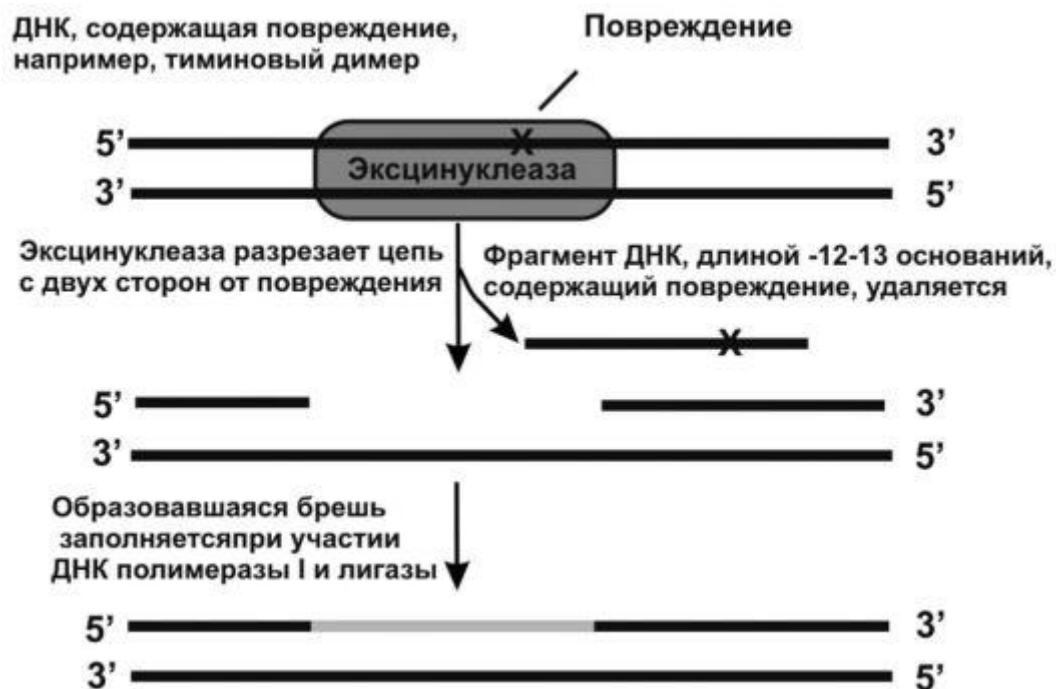


Рис.

идет с участием ДНК-полимераз ОиЕ, а участок, вырезаемый из поврежденной цепи ДНК, имеет длину 29 нуклеотидов (вместо 12 у кишечной палочки).

Репарация поврежденных нуклеотидов включает мисмэтч-репарацию или репарацию, некомплементарных (неканонических) или не «уотсон-криковских» пар оснований - это так называемая репарация ошибочно спаренных оснований (см. выше).

Репарация односторонних и двусторонних разрывов ДНК

Помимо рассмотренных выше механизмов репарации известны механизмы восстановления односторонних разрывов (разрывы связей между основаниями в одной нити молекулы ДНК) и двусторонних разрывов (разрывы связей между основаниями в двух нитях молекулы ДНК).

Репарация односторонних разрывов ДНК

Репарация односторонних разрывов ДНК - эта прямая репарация. Она вызывается в ответ на действие ионизирующей радиации и обеспечивается последовательным действием ферментов: 3'-фосфодиэстеразы, ДНК-полимеразы- β и ДНК-лигазы (ДНК-полинуклеотидлигазы). Восстановление такого разрыва идет с использованием в качестве матрицы неповрежденной комплементарной цепочки ДНК.

Репарация двусторонних разрывов ДНК

Двусторонние разрывы молекулы ДНК являются самым опасным для клетки типом повреждений ДНК. Они, как правило, приводят к развитию генетической нестабильности, появлению точковых мутаций и хромосомных aberrаций и последующей гибели клеток.

Известны два механизма репарации двусторонних разрывов ДНК: нехомологичное воссоединение разорванных концов и гомологичная рекомбинация.

Нехомологичное воссоединение разорванных концов ДНК

Нехомологичное воссоединение разорванных концов ДНК происходит между концами молекулы, которые имеют нехомологичные последовательности нуклеотидов разной длины или очень короткие гомологичные участки. Этот механизм репарации не безошибочен и часто служит источником точковых мутаций, так как восстановление исходной структуры молекулы ДНК возможно только при воссоединении концов одной и той же нити. Если же это условие не соблюдается, то формируются хромосомные aberrации: делеции, дупликации,

инверсии, инсерции и транслокации (см. главу 5). У млекопитающих нехомологичное воссоединение происходит с участием белка Rad50, родственных ему белков, факторов Ku, ДНК-лигазы IV и факторов сайленсинга.

Гомологичная рекомбинация

Механизм гомологичной рекомбинации был изучен у *Drosophila melanogaster*. Предполагается, что он должен существовать в клетках человека, однако убедительных доказательств этого до сих пор не получено. Считается, что в ходе гомологичной рекомбинации на одной из нитей ДНК образуется брешь, по размеру равная удаляемому у бактерий элементу (Р-элемент). Восстановление бреши происходит с участием копии Р-элемента, находящейся на сестринской хроматиде и используемой в качестве матрицы для репаративного синтеза.

Вместе с тем, во время репликации возможно образование одноцепочечной брешы напротив нерепарированного участка, и эта ситуация не может быть исправлена безошибочно без привлечения другой молекулы ДНК.

Поэтому данный механизм обеспечивает восстановление только в тех случаях, когда повреждены обе цепи ДНК.

Белки Альбертса и их роль в репликации и репарации ДНК

В 1968 г. были обнаружены белки Альбертса, или белки SSB, принимающие участие в репарации ДНК. Эти белки благодаря организации их третичной структуры обладают способностью электростатически связываться с ДНК. Белки SSB содержат кластер положительно заряженных аминокислотных остатков, но при этом их общий заряд остается отрицательным, благодаря чему они имеют повышенное сродство к одноцепочечной ДНК.

Если при нарушениях вторичной структуры двухцепочечной ДНК в отдельных нитях ее спирали образуются «расплавленные участки», то белки Альбертса связываются с ними, легко на них садятся и их «выпрямляют». При этом белки SSB, сидящие на комплементарных цепях молекулы, не дают им «схлопнуться», так как за счет электростатических взаимодействий они имеют мощный отрицательный заряд, проявляя сродство друг к другу и покрывая «расплавленный участок» сплошным слоем - это *стехиометрическое количество белка*. Иными словами, эти белки не денатурируют молекулу ДНК, а лишь фиксируют ее одноцепочечное состояние.

Участие белков SSB в репликации молекулы ДНК абсолютно необходимо для клетки: они удерживают в репликативной вилке в одноцепочечном состоянии обе матричные нити, защищая каждую нить от действия нуклеаз и избирательно стимулируя работу ДНКполимеразы (РНК-полимераза не использует одноцепочечную ДНК, покрытую SSB).

Таким образом, роль белков SSB в репарации одно- и двухнитевых разрывов ДНК сегодня вполне доказана.

Пострепликативная (рекомбинационная) репарация ДНК

В 1968 г. У. Рапп и П. Ховард-Фландерс обнаружили у обработанных УФО бактерий пострепликативную репарацию или рекомбинационную репарацию матричной нити ДНК, в которой содержалось множество невырезанных димеров тимина, и в момент, когда ДНКполимераза, ведущая репликацию, доходила до первого димера, она «застывала» в этой точке на 10 с, затем перебиралась за димер тимина (каким-то непонятным образом) и возобновляла синтез позади дефекта до тех пор, пока не «натыкалась» на очередной димер. Таким образом, участки дочерней нити содержали брешы (неудвоенные при синтезе ДНК), а в участках матричной нити напротив брешей сохранялись незалеченные дефекты. Затем следовала пострепликативная репарация поврежденных участков, в которой принимали участие белки гес А, лигазы и ДНК-полимеразы. Этот механизм напоминал механизм рекомбинации: сначала молекула белка гес А присоединялась к зоне брешы, где под его контролем происходила рекомбинация, в ходе которой участок комплементарной цепи сестринской нити переносился в зону брешы, брешь застраивалась в ходе репликативного синтеза, и лигаза соединяла концы новой и старой нитей молекулы.

SOS-репарация ДНК

SOS-репарация ДНК - это последняя возможность для ДНК клетки, которая подошла к репликации, имея повреждения, не устраненные с помощью всех перечисленных выше

механизмов репарации. В таком случае клетка может погибнуть, так как репликация на первом же неустранившем повреждении может «заstopориться».

Вместе с тем, клетка имеет предназначенный для таких целей крайне рискованный механизм, получивший название SOS-репарации ДНК. Этот механизм был впервые обнаружен в 1953 г. Дж. Уэйглом и

в 1974 г. назван М. Радманом *W-реактивацией* (возможность для димеров тимина «дожить» до следующей репликации). В ходе механизма SOS-репарации индуцируется синтез белков, присоединяющихся к ДНК-полимеразному комплексу и «загрубляющих» его работу таким образом, что подпорченный комплекс становится способным строить дочернюю нить ДНК напротив дефектных звеньев матричной нити, и при этом на дочерней нити появляется много ошибок (мутаций). В результате клетка спасается от гибели на данном этапе и может обеспечить митоз, хотя будут ошибки и высокий риск гибели клетки.

Следует отметить, что перечисленные выше механизмы репарации молекулы ДНК относятся в основном к достижениям классической генетики. Вместе с тем, в последние десятилетия благодаря достижениям международной научной программы «Геном человека» (см. главу 1) общий список механизмов репарации ДНК был существенно дополнен другими ранее малоизвестными и новыми механизмами.

Восстановление молекулы ДНК с помощью механизмов, открытых в последние годы

Механизм репарации с участием фермента поли-АДФ-рибозаполимеразы

Белок-фермент поли-АДФ-рибоза-полимераза (ПАРП) относится к одному из ядерных факторов, первым распознающим повреждение ДНК. Этот фактор управляет запуском механизма репарации ДНК в живых клетках, начиная с места повреждения ДНК, и входит в мультипротеиновый комплекс (МР-комплекс), включающий еще фактор XRCC1, ДНК-лигазу III и бета-ДНК-полимеразу.

Присутствие ПАРП в этом комплексе обеспечивает направление всех участников репарации ДНК к сайтам повреждения ДНК *in vivo*, что облегчает восстановление молекулы ДНК.

Входящий в состав МР-комплекса фактор XRCC1 условно относится к «строительным лесам», индивидуально взаимодействующим с каждым компонентом комплекса в качестве опорной молекулярной структуры. С тех пор, как было обнаружено полиАДФ-рибозилирование этого фактора *in vitro*, было предположено, что ПАРП способен регулировать активность МР-комплекса путем модифицирования XRCC1-белка *in vivo*, что нарушает его взаимодействие с другими компонентами комплекса. В пользу такого предположения свидетельствовали данные, что сверхэкспрессия фактора XRCC1 подавляет активность ПАРП *in vivo*.

В настоящее время эта гипотеза продолжает изучаться; ее подтверждают данные, что входящая в МР-комплекс ДНК-лигаза III ингибирует активность ПАРП *in vitro*, когда ее количество превышает количество ПАРП.

Модель репарации с антирекомбинационным эффектом фермента поли-АДФ-рибозаполимеразы

В последние годы предложена модель репарации ДНК с антирекомбинационным эффектом ПАРП (Sato and Lindahl, 1992). Согласно этой модели, ПАРП взаимодействует с разрывами ДНК и совместно с реакциями поли-АДФ-рибозилирования соседних белков

специфически защищает концы ДНК от действия нуклеаз и/или блокирует процесс рекомбинации. Это подтверждается на примере экспериментальных животных, дефицитных по гену ПАРП. Показано, что отсутствие ПАРП стимулирует процесс рекомбинации и ведет к увеличению у них частоты образования лимфом. Кроме того, ПАРП может «рекрутировать» факторы репарации ДНК путем модификации хроматиновых белков.

Репарация ДНК с участием метилтрансфераз

При помощи поддерживающих ферментов цитозин-ДНКметилтрансфераз (М-таз) можно проводить *de novo* метилирование остатков цитозина в ДНК с образованием 5-метилцитозина (5-mC), а также метилирование олигонуклеотидов, содержащих ошибочно спаренные основания.

Репарация ДНК с участием хеликаз

Среди ферментов, участвующих в репарации ДНК, большое внимание уделяется группе ДНК-хеликаз (хилаз). Это филогенетически устойчивые ферменты, способные разделять цепи молекулы ДНК, переводя ее из нативного состояния в одноцепочечное. Хеликазы участвуют во всех фундаментальных генетических процессах с разделением родительских цепей молекулы ДНК или основанных на таком разделении процессах: репликации, транскрипции, рекомбинации, репарации, сегрегации хромосом, процессинга и сплайсинга пре-мРНК, транспорта мРНК в цитоплазму и ее трансляции на рибосомах (см. главы 2 и 3). В ходе этих процессов хилазы обеспечивают доступ к открываемым ими одноцепочечным участкам молекулы ДНК для действия других ферментов. Хилазы отличаются друг от друга направлениями активности (3' - 5' и 5' - 3') цепи ДНК, предпочтительным сродством с 3'- и 5'-концами цепи ДНК, сродством с кофакторами - нуклеотидтрифосфатами. Эти энергозависимые фер-

менты расходуют энергию, образующуюся при гидролизе нуклеотид- 5'-трифосфатов (обычно это АТФ), и действуют в присутствии ионов Mg^{2+} . При проведении какого-либо генетического процесса хилазы, как правило, объединяются в комплексы.

По сродству к субстрату хилазы делятся на группы: ДНК-хеликазы, РНК-хеликазы и хеликазы, работающие на гибридных молекулах РНК/РНК. Первые участвуют в инициации транскрипции, рекомбинации, репарации и сегрегации хромосом. Вторые участвуют в биогенезе рибосом, транскрипции мРНК, сплайсинге пре-мРНК, созревании и транспорте мРНК в цитоплазму и ее трансляции на рибосомах.

Хилазы классифицируются по активности (способности двигаться вдоль молекулы ДНК, разделяя ее на отдельные цепи), наличию 7 специфических мотивов последовательностей аминокислот, присущих всему семейству хилаз, но не обязательных для отдельных из них. Эти мотивы обозначаются цифрами: I, Ia, II, III, IV, V и VI (они обеспечивают связи хилаз с ДНК и координацию движения во время катализа). И хотя эти мотивы специфичны для хилаз, они также обнаруживаются у белков, использующих нуклеотидтрифосфаты в качестве кофактора (подобно хилазам). Мутации этих мотивов вызывают дефицит АТФ-зависимой активности хилаз. Наряду с хилазами выделены белки с мотивами, не обладающие хилазной активностью. Их также оказалось 7, и они получили название *белков-претендентов в хилазы*. Полагают, что такие белки должны также участвовать в регуляции внутриклеточных генетических процессов.

Кроме того, были выделены 2 механизма перемещения хилаз с разной скоростью по нуклеотидной цепи молекулы ДНК: активно катящаяся модель и постепенно скользящая модель.

Первый механизм осуществляется димером ДНК-хеликазы, который за один цикл (поворот молекулы) разъединяет определенное число н.п.

Второй механизм осуществляется мономером ДНК-хеликазы, движущимся с определенной скоростью.

Количество и свойства генов, кодирующих хеликазы в геноме человека, окончательно не определены, но некоторые гены хорошо изучены. Это гены хеликаз, входящие в семейства TFIIH и RecQ. Причем первое семейство является основным транскрипционным фактором, состоящим из девяти субъединиц, включающих две хилазы (XPB и XPD), 4 белка (p62, p52, p44 и p34), САК-комплекс, акти-

вирующий киназу (CDK-activating-kinase), и 2 циклина (H и Cdk7).

TFIIH обладает АТФ-зависимой хеликазной и киназной активностью, за которую отвечают соответственно субъединицы XPB и XPD. Киназная активность обеспечивается еще и комплексом САК.

Показано также, что TFIIH участвует в репарации ДНК («узнает» участок ДНК длиной 20-30 н.п., содержащий повреждение, и вырезает его) и служит фактором транскрипции (взаимодействует с промоторной областью, раскручивая участок ДНК длиной 11-13 н.п. вокруг сайта инициации транскрипции).

Репарация нонсенс-транскриптов мРНК

Примерно одна треть наследственных болезней и многие формы рака обусловлены нонсенс-транскриптами или мутациями сдвига рамки считывания (см. главу 5). В результате этих мутаций возникают ПСК и появляются неполноценные белки.

Вместе с тем в клетках существуют системы, распознающие и разрушающие большинство нонсенс-транскриптов. Две такие (универсальные для эукариот) системы получили название: NMD и SMD (см. главу 7).

Завершая рассмотрение клеточных систем репарации ДНК, следует отметить, что восстановление дефектов, возникающих в молекуле ДНК в результате воздействия на нее мутагенных факторов, является важнейшим свойством всех живых организмов.

Среди увеличивающегося количества механизмов репарации ДНК есть механизмы простые, запускаемые сразу после повреждения молекулы ДНК, и сложные, растянутые во времени и требующие синтеза целого ряда ферментов. К последним относятся механизмы, связанные с разными этапами жизненного цикла клетки, а также спасением клетки в SOS-порядке или порядке введения новых мутаций в молекуле ДНК. Все восстановительные механизмы имеют общие патогенетические особенности и тесно переплетаются с процессами канцерогенеза, мутагенеза, тератогенеза и старения клетки и организма.

БОЛЕЗНИ ГЕНОМА

Болезни генома (генетической нестабильности) представлены во всех областях молекулярной медицины. Еще со времен классической генетики наиболее известными из них считаются болезни репарации

ДНК.

В России в 80-90-е годы XX в. болезни репарации ДНК изучались под названием болезней генетической (хромосомной) нестабильности, что соответствовало их ведущему признаку - повышенной ломкости хромосом.

В настоящее время спектр этих болезней значительно расширен. Наряду с классическими болезнями репарации ДНК, такими, как атаксия-телеангиэктазия (АТ), анемия Фанкони (АФ), пигментная ксеродерма (ПК), прогерия Хатчинсона-Гилфорда (ПРХГ), синдром Блума (СБ), к этому классу принадлежат следующие группы заболеваний:

- аутоиммунные заболевания: системная красная волчанка, склеродермия, ревматоидные артриты и др.;
- наследственные ферментопатии: Кнаппа-Комровера, Леша-Найана, Пендреда и др.;
- хромосомные синдромы: Дауна, Клайнфельтера, Патау, Шерешевского-Тернера и Эдвардса; ретинобластома, обусловленная делецией хромосомы 13 (13q14);
- моногенные болезни: атаксия Фридрейха, болезнь Дарье-Уайта, синдромы Гарднера, базально-клеточного невуса, Марфана, Ротмунда-Томсона, Корнелии де Ланге, тестикулярная феминизация, фотодерматоз и др.;
- полигенные болезни: псориаз, системный склероз и др. Генетическая нестабильность проявляется также у практически

здоровых носителей сбалансированных перестроек хромосом, например, при транслокации Робертсоновского типа между хромосомами

14 и 21.

Общими клиническими проявлениями болезней генома служат: выраженные неврологические проявления, снижение продолжительности жизни, симптомы преждевременного старения, повышенная частота развития злокачественных опухолей.

В первую очередь рассмотрим примеры классических болезней генома, или болезней репарации ДНК.

Моногенные болезни, связанные с повышенной фоточувствительностью и нарушением эксцизионной репарации ДНК

Наиболее известным заболеванием этого класса является ПК. Ее частота в популяции составляет 1:40-250 тыс. человек. ПК - это первая болезнь репарации ДНК, описанная у человека. Она гетерогенна: имеет 7 групп комплементации - А, В, С, D, E, F и G. В частности,

группа А широко распространена в Японии, где она составляет примерно 20% от всех больных ПК, и ее связывают с дефектом в системе пострепликативной репарации (XP_{tal}). Группы комплементации В и С распространены в странах Европы, а группы D, E, F и G - в других странах мира.

Ген ПК группы А локализован в локусе 9q34.1. Его продуктом служит ДНК-связывающий белок, имеющий два мотива типа «цинковые пальцы» (см. главу 8).

Ген ПК группы В картирован в локусе 2q21, его белковым продуктом служит геликаза, входящая в состав TFIIH-фактора транскрипции (см. выше).

Ген ПК группы С картирован на хромосоме 3, он кодирует белок p125. Функция этого белка окончательно не определена, хотя известно, что совместно с белком p58 он участвует в восстановлении репарационной активности.

Ген ПК группы D картирован в локусе 19q13.2-q13.3, его белковый продукт (подобно продукту гена ПК группы В) характеризуется геликазной активностью. Полагают, что оба генных продукта - это две субъединицы одного ТРПН-фактора.

Ген ПК группы F картирован в локусе 16p13.13, он продуцирует эндонуклеазу, надрезающую ДНК с 5'-стороны.

Ген ПК группы G картирован в локусе 13q33 и также продуцирует эндонуклеазу, но надрезающую ДНК уже с противоположной 3'-стороны.

Основными симптомами этой болезни являются: высокая чувствительность к действию УФО, пигментация, сухость, изъязвление и рубцы кожи. У больных развивается рак кожи и слизистых оболочек (меланомы, карциномы).

В каждом втором-третьем случае выражена неврологическая симптоматика (связана с ранней апоптотической гибелью нейронов).

В последние годы установлено, что 3 из 7 групп комплементации ПК (группы В, D и G) могут проявляться как генокопии другой болезни репарации ДНК - синдрома Коккейна (СК), обусловленного дефектами эндонуклеаз системы эксцизионной репарации.

В подобных случаях у больных ПК можно выделить общие с СК клинические признаки, включая повышенную чувствительность к УФО. Поэтому и диагнозы у таких больных обозначаются как ПКВ/ СК, ПКD/СК, ПКG/СК.

Вместе с тем, СК - это второе заболевание (после ПК), описанное как болезнь эксцизионной репарации. Данный синдром проявляется карликовостью (при нормальном уровне гормона роста), кальцификацией костей черепа, атрофией зрительных нервов, глухотой и ускоренным старением. При этом синдроме выявлены две группы комплементации: А и В. Ген СК группы А локализован в локусе 5p12-p14, он кодирует белок, входящий в состав транскрипционного комплекса ТРПН (см. выше). Ген СК группы В локализован в локусе 10q11.2, он кодирует белок, имеющий общие последовательности нуклеотидов с фактором, контролирующим транскрипцию и репарацию у *E. coli*, а у человека он, по-видимому, привлекает белки эксцизионной репарации в район остановившейся транскрипции.

Третья болезнь репарации ДНК - это трихотрихостеомия (ТХД). При этом заболевании гиперчувствительность к УФО проявляется примерно у половины больных.

Болезнь сопровождается повышенной ломкостью волос, что связано с уменьшением концентрации в них серосодержащих белков, имеющих дефицит цистеина.

К основному симптомокомплексу относятся: аномалии развития зубов и кожи, ихтиоз, задержка полового развития, физическая и умственная отсталость, предрасположенность к раку кожи.

В ряде случаев установлено соответствие дефекта репарации ДНК при ТХД дефектам репарации, отмеченным при всех группах комплементации ПК, кроме группы В.

Особенно часто такое соответствие характерно для гена ПК группы D. В связи этим было предположено, что ген ПК D полифункционален и его белковый продукт принимает участие в эксцизионной репарации и транскрипции, зависимой от РНК-полимеразы II.

Кроме того, в клетках больных с ТХД производятся не две, а четыре субъединицы фактора транскрипции TFIIH.

Четвертое заболевание, связанное с повышенной фоточувствительностью и нарушенной репарацией ДНК, - это синдром Блума (СБ).

Ген СБ, или ген BLM (Bloom-мутация), картирован в локусе 15q26 рядом с протонкогеном *fes*. Предполагается, что этот ген имеет ДНК-зависимую АТРАЗную и ДНК-зависимую геликазную активность, причем с первой связано поддержание стабильности хромосом в соматических клетках, а вторая играет ключевую роль в репарации ДНК.

Симптоматика СБ: пропорциональная пре- и постнатальная задержка роста, гиперили гипопигментация кожи, краснота на

лице в виде «бабочки», предрасположенность к опухолям, высокий уровень спонтанных хромосомных aberrаций и СХО.

Моногенные болезни, связанные с двухнитевыми разрывами ДНК при полном отсутствии эксцизионной репарации

Единственный пример заболевания, связанного с двухнитевыми разрывами ДНК при полном отсутствии механизмов эксцизионной репарации, - АТ, или синдром Луи-Бар. Болезнь встречается с частотой 1:40-100 тыс. человек, характеризуется мозжечковой атаксией, телеангиэктазиями, иммунодефицитом, высокой ломкостью хромосом и предрасположенностью к злокачественным опухолям (см. главу 5).

В последние три десятилетия был изучен ряд генетических особенностей этого заболевания. Оказалось, что хромосомы больных с АТ имеют укороченные почти в 3 раза теломеры, они (хромосомы) высоко чувствительны к действию ионизирующей радиации и химических радиомиметиков, что проявляется в увеличении выхода хромосомных нарушений (двухнитевых разрывов) и снижении выживаемости соматических клеток, для которых характерна радиорезистентность синтеза ДНК, что проявляется в отсутствии синтеза белка p53, в норме отвечающего за задержку (остановку) митотического цикла на стадиях G₁-S и G₂-M, необходимую для репарации повреждений ДНК. Иными словами, клетки больных с АТ «просто не имеют времени» для восстановления нормальной структуры ДНК с помощью механизмов эксцизионной репарации. Поэтому для ликвидации двухнитевых разрывов ДНК в таких клетках используются механизмы пострепликативной репарации.

Моногенные болезни с нарушением эксцизионной репарации вне связи с фоточувствительностью и двухнитевыми разрывами ДНК

К болезням с нарушением эксцизионной репарации вне связи с фоточувствительностью и двухнитевыми разрывами ДНК относятся: анемия Фанкони (АФ) и прогероидные синдромы Хатчинсона-Гилфорда и Вернера.

Анемия Фанкони

АФ - это семейная гипоили апластическая анемия с врожденной недостаточностью гемопоэтического ростка костного мозга, нарушениями пигментации кожи, телеангиэктазиями, БАР и МАР

(см. главу 23), предрасположенностью к миелоидной лейкемии и другой симптоматикой.

Постоянным признаком заболевания служит спонтанная хромосомная нестабильность, выявляемая в клетках костного мозга, кожи и лимфоцитов.

АФ - это гетерогенная болезнь, имеющая 8 групп комплементации (А, В, С, D, Е, F , G и H), в том числе для групп А и С гены картированы в локусе 9q22.3, однако их белковые продукты недостаточно изучены. Следует отметить противоречивость данных, относящихся к отсутствию у больных с АФ повышенной фоточувствительности ДНК, хотя такие данные ранее были получены (Higurashi M., Cohen P.E., 1975).

Прогерия Хатчинсона-Гилфорда

ПРХГ - это редко встречающееся заболевание (частота 1:1 млн человек). Продолжительность жизни больных обычно не превышает 15 лет. Ген болезни не локализован.

Основная симптоматика: низкий рост, «птичий профиль» лица, преобладание мозговой части черепа над лицевой, венозная сеть на коже головы и лба, сухая истонченная кожа, отсутствие бровей и ресниц, часто тотальная алопеция, дефекты количества и формы зубов, полное отсутствие подкожно-жировой клетчатки, задержка физического, психомоторного и умственного развития; в моче - высокое содержание гиалуроновой кислоты. Больные, как правило, бесплодны.

Причины ранней смерти: инфаркт миокарда с генерализованным атеросклерозом и фиброзом, жировое перерождение тканей мозга и паренхиматозных органов.

В клетках больных ПРХГ установлены дефекты репарации сшивков ДНК-белок, индуцированных химическими соединениями; резко сниженное число Хейфлика и его взаимосвязь с врожденным укорочением теломер.

По аналогии с СК (см. выше) для детской прогерии (ХГ) предполагается аутосомно-рецессивный тип наследования, хотя возможна вновь возникшая аутосомно-доминантная мутация, обуславливающая укорочение теломер.

Синдром Вернера

Синдром Вернера (СВ) или прогерия взрослых, характеризуется преждевременным старением, проявляющимся только после периода половой зрелости организма. Больные рано седеют и лысеют (до 20 лет).

Ген болезни (ген WRN) локализован в локусе 8p12-p21, продуцирует фермент геликазу, но не входит в состав основного транскрипционного комплекса TFIIN. Именно эта особенность отличает СВ от ПК групп В и D и СК группы В, при которых активность геликазы имеет прямое отношение к репарации, связанной с транскрипцией.

Основная симптоматика: «стареющая кожа» (гиперпигментация, гиперкератоз, морщинистость, сухость, телеангиэктазии), глухой голос, изменения внутренних органов, характерные для стареющего организма (атеросклероз сердца и сосудов, катаракта, остеопороз, сахарный диабет; доброкачественные или злокачественные опухоли), в моче - высокое содержание гиалуроновой кислоты. Число Хейфлика резко ограничено не только по количеству делений, но и по продолжительности клеточного цикла (в 3-5 раз ниже нормы). В отличие от ситуации при ПРХГ, при СВ хромосомы больных не имеют укороченных теломер.

Онкологические заболевания, связанные с нарушением репарации

После описания ретинобластомы, обусловленной делецией хромосомы 13 (13q14; см. главы 17 и 25), начались интенсивные исследования роли генных мутаций при наследственно обусловленных формах рака. Было показано, что при многих формах рака генные мутации ведут к нарушению репарации неправильно спаренных оснований,

возникающих как ошибки репликации (вследствие небольших делеций или инсерций). Такие мутации аналогичны мутации в гене *mutS* у *E. coli*, приводящей к нарушениям репарации неправильно спаренных оснований.

У человека мутация в одной из копий гена *MSH2* обуславливает (с высокой вероятностью) развитие семейного неполипозного рака толстого кишечника (HNPCC) и рака эндометрия. Установлено также, что при этих заболеваниях в опухолевых клетках отсутствует вторая копия гена и отмечается крайне высокая частота микросателлитных повторов (в 100 раз выше нормы). Кроме того, у человека выявлены формы рака грудной железы, связанные с генами *BRC1* и *BRC2*, формы болезни Альцгеймера, связанные с четырьмя генами (*PS1-PS4*) и геном прионного белка, а также другие примеры генокопирования ряда моногенных и полигенных заболеваний, ассоциированных с опухолями (см. главы 17 и 25).

ЧАСТЬ 2 ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРОГРАММА ОНТОГЕНЕЗА. ОНТОГЕНЕЗ ГЛАВНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ И ЗАЩИТНЫХ СИСТЕМ И ЕГО НАРУШЕНИЯ. ПОКАЗАТЕЛИ ЗДОРОВЬЯ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГРУЗ. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ. ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЫ ГЛАВА 12 ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРОГРАММА ОНТОГЕНЕЗА

Общие данные

Онтогенез или индивидуальное развитие организма, базируется на генетической программе всего жизненного цикла, закодированной у человека в 3,165 млрд нуклеотидных последовательностей молекулы ДНК.

Как известно, отдельно взятый родительский геном не может дать начало молекулярной жизни, и для того, чтобы такая жизнь зародилась, необходима встреча двух геномов (двух биологических начал): материнского и отцовского (яйцеклетки и сперматозоида).

Зарождению молекулярной жизни соответствует момент формирования зиготы или клетки-родоначальницы, из которой в ходе антенатального (внутриутробного) онтогенеза развивается многоклеточный организм, в основном подготовленный к существованию в новой для него внешней среде.

Упрощенно можно представить зиготу как клетку с общим объемом наследственной информации, состоящей из двух разных по происхождению и примерно одинаковых по ее содержанию частей - родительских геномов (см. главу 5). Генотип зиготы содержит около 40 тыс. генов, которые, как правило, имеют по 2 аллеля одного и того же гена или две копии (кроме генов мтДНК).

И материнская, и отцовская копии каждой пары аллелей либо полностью дублируют друг друга по содержанию информации, и тогда говорят о гомозиготном состоянии, либо информация в них различается - это гетерозиготное состояние (см. главу 4).

Обязательное присутствие двух родительских геномов в генотипе зиготы, а затем в каждой соматической клетке необходимо для непрерывного продолжения в ряду клеточных поколений зародившейся в зиготе молекулярной жизни. При этом постоянно «эксплуатируются» как аллели ядерных генов отцовского и материнского происхождения, так и аллели митохондриальных генов только материнского происхождения. Иными

словами, материнский геном несет наибольшую нагрузку в сравнении с отцовским геномом, что названо «биологическим матриархатом» (см. главу 5).

Одним из доказательств возможности одновременной «эксплуатации» двух родительских геномов служит механизм репликации молекулы ДНК, когда репликативная вилка формирует на каждой из двух разошедшихся матричных цепочек старой молекулы по одной новой цепочке, и в результате образуются две новые молекулы ДНК (см. главу 2).

Другим примером является механизм репарации тиминовых димеров, возникших при повреждении одной из двух цепочек молекулы ДНК. При этом вторая противоположная ей цепочка (неповрежденная) служит матрицей (эталон) для восстановления поврежденной цепочки и «управляет» ее репарацией (см. главу 11).

В качестве дополнительных примеров следует привести однородительскую изодисомию по отцовской хромосоме 15 при синдроме Ангельмана и материнской хромосоме 15 при синдроме Прадера-Вилли (см. главу 4).

Вместе с тем, наблюдается разная ответственность каждого родительского генома за события, происходящие в клетках и организме, например данные по импринтингу (см. главу 28).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

В основе генетической программы онтогенеза лежит ряд биологических закономерностей.

Главная (первая) закономерность - это, безусловно, потенциал молекулы ДНК, обеспечивающий зарождение, развитие, стабилизацию и угасание всех функций и навыков организма. От содержания и величины этого потенциала зависит *онтогенетическое здоровье*, характеризующееся геномным, протеомным и репродуктивным здоровьем, от которого зависит «качество» и продолжительность жизни человека.

Согласно теории системогенеза, разработанной П.К. Анохиным в 1975 г., развитие - это становление функциональных систем организма, а рост - это соподчиненная функция этих систем. Основная роль в становлении функциональных систем организма принадлежит структурам головного и спинного мозга.

Общебиологический смысл развития и роста любого организма заключается в динамическом процессе пропорционального увели-

чения длины и массы тела, что обеспечивает наступление половой зрелости и воспроизводство потомства в соответствующем для этого возрасте. Вместе с тем, у человека конечная цель развития и роста заключается в интеллектуальном и социальном совершенстве. Однако законы развития социальной сферы непосредственно не подчинены законам биологической эволюции, и поэтому социальное развитие реализуется через воспитание и образование. У человека генетически детерминированы следующие интеллектуальные характеристики: приобретение знаний и навыков, ориентация в обстановке (пространстве), переключение внимания и памяти, абстрактное мышление, анализ и синтез явлений.

Вторая закономерность - это разнообразие связей между генами и признаками, генотипом и фенотипом, которые можно продемонстрировать, начиная с формулы Дж. Бидла и Э. Тейтема: «Один ген - одна полипептидная цепь» (1941). Наряду с этой формулой во второй половине XX в. были открыты другие формулы: «два или семь генов - одна полипептидная цепь», «один ген или разные его участки - несколько полипептидных

цепей». Все они объясняют молекулярно-генетические и биохимические причины и механизмы формирования и изменчивости признаков и фенотипов на основе синтеза белковых продуктов онтогенеза (см. ниже).

Третья закономерность - это несовпадение во времени фазы максимальной интенсивности деления клеток и фазы их дифференцировки. В основе этого несовпадения лежит *закон прогрессивного дифференцирования*, согласно которому «относительная масса недифференцированных тканей в организме уменьшается обратно пропорционально его возрасту» (Шмальгаузен И.И., 1938, 1946). Этот закон объясняет тесную взаимосвязь клеточной пролиферации и дифференцировки тканей организма в ходе онтогенеза.

Четвертая закономерность - это способность организма стабилизировать процесс развития в тех случаях, когда развитие нарушается под влиянием болезней и других неблагоприятных факторов окружающей среды, и возвращаться к заданной программе, если их действие прекращается. Эта закономерность впервые описана в 1957 г. и названа гомеорезом или канализированием роста (Уодингтон К.Ф., 1964).

Гомеорез объясняет важную роль факторов среды в этиологии и патогенезе общей и наследственной патологии человека (см. главу 17) и служит основой для разработки эффективных методов ее терапии.

При этом гомеорез существенно отличается от гомеостаза, который относится к пятой закономерности онтогенеза (см. главу 2).

Нетрудно заметить, что все указанные биологические закономерности составляют основу двух противоположных, но тесно связанных между собой процессов онтогенеза: прогресса (прямое развитие, или эволюция) и регресса (обратное развитие, или инволюция).

Прогресс и регресс

Если прогресс связан с переходом старого качественного состояния в новое качественное состояние организма с соответствующими изменениями его генотипических и фенотипических характеристик, то регресс связан с иногда быстрым, а чаще - медленным угасанием (старением) и утратой этих характеристик как предыдущих возможностей и навыков организма.

Очевидно, что оба процесса идут параллельно друг другу и представляют собой единую программу развития, стабилизации и угасания функций и навыков организма. Эта единая универсальная программа контролирует все происходящие в течение жизни организма молекулярные реакции и процессы, определяет их профиль и спектр, как правило, адекватный действию факторов окружающей среды.

Вместе с тем, если говорить о прогрессе как стремлении (мотивации) организма к развитию, то следует выделить две тенденции (в определенном смысле философские), наблюдаемые при взаимодействии с факторами среды: непреодолимое стремление организма к объединению со средой (первая) и включение компонентов среды в собственные функциональные системы (вторая). Обе тенденции являются вектором или движущей силой генетической программы, с которой организм стремится к так необходимому для него развитию. В связи с этими главными тенденциями, а также на основе приведенных выше характеристик программы и ее биологических закономерностей, можно сделать следующие выводы и предположения.

Во-первых, в антенатальном онтогенезе генотип организма беременной женщины:

- контролирует («анализирует») способность (состоятельность) генотипа зиготы к созданию стабильной генетической программы развития;
- на основе этого анализа «выбирает» в зиготе ведущий и ведомый материнский или отцовский геном, как правило, соответствующий полу развивающегося организма;
- согласно сделанному выбору «обучает» гены (генотип) развивающегося организма стабильному функционированию (синтезу белковых продуктов онтогенеза) в ходе пролиферации, дифференцировки и миграции клеток, предназначенных для формирования тканей, органов и систем организма;
- «готовит» развивающийся организм к рождению и встрече с новыми для него условиями окружающей среды.

Во-вторых, в раннем постнатальном онтогенезе генетическая программа родившегося организма только в основном готова к стабильной реализации своего потенциала в новых условиях окружающей среды, и организму необходима длительная адаптация к воздействию этих условий, что связано с корректировкой содержания генетической программы.

В-третьих, эффективность адаптации организма к новым условиям окружающей среды и эффективность корректировки программы онтогенеза зависят от эффективности функционирования главных регуляторных и защитных систем организма (нервной, эндокринной и иммунной), ферментативных систем его органов и тканей, клеточных систем репарации и других систем, которые взаимодействуют с генами (генотипом) организма по принципу обратной связи с помощью ДНК-связывающих (контролирующих) факторов репликации, транскрипции, трансляции и других генетических процессов. Все три вывода имеют прямое отношение к основным факторам онтогенеза, которые будут сформулированы в конце данной главы.

Вернемся к дальнейшему рассмотрению прогресса и регресса. В ходе внутриутробного этапа онтогенеза в развивающемся организме преобладают прогрессивные процессы. В начале и середине постнатального онтогенеза прогресс и регресс постепенно сменяют друг друга. При этом чередуются разные по продолжительности периоды стабилизации и последующей перестройки функций организма, сохраняющие определенный баланс взаимоотношений.

Одним из наиболее важных периодов постнатального онтогенеза (по вкладу в сохранение и поддержание онтогенетического здоровья) является период после выполнения организмом своей главной биологической задачи по воспроизводству потомства. В середине или конце этого периода либо непосредственно вслед за ним в организме начинается медленный и сначала почти незаметный, но постепенно ускоряющийся период устойчивого перехода в инволюционную фазу, когда прогресс становится для организма мало характерным.

В завершающем периоде постнатального этапа онтогенеза в стареющем организме происходят постепенные процессы угасания и утраты функций и навыков. Для иллюстрации тесных связей прогресса и регресса в качестве примера следует привести параллельный отбор наиболее эффективных межнейронных связей в ходе нейроонтогенеза и связанный с ним апоптоз освободившихся от этих связей нейронов (см. главы 10 и 13).

Другим примером служит нейроонтогенез стриопаллидарной и мозжечковой систем, известных как обучающие системы мозга. Эти системы играют ведущую роль в развитии двигательных автоматизмов. В зрелом возрасте (после 40-50 лет) основная часть движений организма автоматизирована, поэтому интенсивность функционирования этих систем снижается, и именно в этот период реализуются такие дегенеративные заболевания мозга, как атаксия Фридрейха, болезни Альцгеймера и Паркинсона, хорея Гентингтона и некоторые другие, обусловленные функциональной недостаточностью указанных систем.

Еще одним примером служат онтогенетические нарушения холестеринового обмена, возникающие из-за молекулярного сродства холестерина с половыми гормонами, что при возрастном уменьшении гормонально зависимой половой активности человека приводит к увеличению частоты развития инсультов и инфарктов.

Молекулярно-генетические и биохимические механизмы

Согласно К.Ф. Уоддингтону (1964), основа онтогенеза - это система закономерных и последовательных взаимодействий продуктов генной активности - белков, отдельных структур развивающегося организма и самого организма (как единого целого) с факторами окружающей среды. Иными словами, генетическая программа онтогенеза - это межмолекулярные взаимодействия материнской и отцовской частей генома при постоянном участии в них факторов окружающей среды, а также базирующиеся на этих взаимодействиях трофические, энергетические, метаболические, ферментативные, гормональные, иммунные, нервные и другого рода реакции, непрерывно происходящие в многоклеточном организме в течение всего жизненного цикла. Эти реакции протекают в клетках и организме с разной интенсивностью и продолжительностью, упорядоченно или неупорядоченно, синхронно или несинхронно.

Морфогенетические процессы в раннем развитии

Развитие многоклеточного организма начинается в раннем эмбриогенезе уже на стадии образования зиготы и представляет собой цепь последовательных морфогенетических процессов. Считается, что инициация ранних стадий развития организма контролируется материнским геномом. К морфогенетическим процессам раннего эмбриогенеза относится пролиферация зиготы (деление-дробление). В ходе дальнейшего онтогенеза прибавляются такие процессы, как миграция, объединение клеток в группы, дифференцировка, апоптоз.

В основе всех этих процессов лежат генетические преобразования, происходящие на уровне ядра клетки: транскрипция генов или образование на одной из двух нитей молекулы ДНК информационной РНК (первичная мРНК, или РНК-транскрипт); процессинг и сплайсинг мРНК и ее транспорт через ядерную мембрану; на уровне цитоплазмы клетки: транспорт мРНК к рибосомам (после прохождения через ядерную мембрану), трансляция мРНК и биосинтез белка в рибосомах (оба процесса идут параллельно друг другу).

Процесс пролиферации зиготы имеет ряд особенностей:

- деление зиготы идет путем цитотомии (деление ядер по борозде дробления), и зародыш из одноклеточного постепенно превращается в многоклеточный - это деление дробления, или стадия дробления эмбриогенеза;
- зигота последовательно превращается в морулу, гастролу и бластулу, давая вновь образующиеся клетки-бластомеры;
- в моруле формируется двухполюсный комплекс из 16 молекул миозина и одной молекулы актина; этот комплекс обеспечивает «сборку-разборку» структурных

компонентов клетки, например, в ходе дендритного спаривания нейронов идет сборка микротрубочек из белка-тубулина (см. главу 13);

- для гастрюлы характерны скользящие амeboидные движения за счет образовавшегося двухполосного комплекса;
- жизненный цикл бластомера отличается от жизненного цикла соматической клетки тем, что из него выпадает постмитотический период интерфазы, а период предмитотического синтеза ДНК начинается в телофазе предшествующего митотического цикла;
- благодаря делению дробления объем тела зародыша не изменяется, но размножается его ядерный материал;
- превращения ядерного материала соответствуют превращениям в ходе обычного митоза - за удвоением количества ДНК (в этом случае редупликацией) следует ее равномерное распределение между дочерними клетками;
- увеличивающееся количество бластомеров при отсутствии их собственного роста способствует повышению величины ядерноцитоплазматического отношения до значений, характерных для соматических клеток (во время роста яйцеклетки это соотношение снижено).

Таким образом, биологическое значение пролиферации зиготы

заключается в редупликации и разделении ДНК, приводящей к размножению генотипа зиготы без увеличения объема зародыша.

Следует отметить, что цитоплазма оплодотворенной яйцеклетки содержит вещества, определяющие пространственную поляризацию делящихся в ней ядер. В период поляризации гены зиготы неактивны, так как они прочно связаны с гистонами. Активация этих генов происходит после восьми делений ядер и миграции их в кортекс. Гены транскрибируются с образованием мРНК под действием РНК-полимеразы II. Процесс начинается со связывания этого фермента с промотором в начале гена. Далее фермент перемещается вдоль гена, синтезируя мРНК. В это время работе РНК-полимеразы II способствуют (или препятствуют) регуляторные гены, которые связываются со специфическими участками ДНК. Конечным результатом действия регуляторного гена служит появление специфического белка-фермента, осуществляющего позитивную (стимулирующую транскрипцию) или негативную (препятствующую транскрипции) регуляцию. Именно эти специфические белки (стимуляторы или супрессоры) образуют основной инициаторный комплекс (ОИК) или «переключатель генов», переводящий гены в активное (экспрессия) или пассивное (репрессия) состояние (см. главы 2 и 3).

В каждый конкретный момент развития из всех генов генотипа в состоянии экспрессии находятся не более 5-10%; остальные гены репрессированы (Карлсон Б., 1983). На ранних стадиях развития активизируются гены, определяющие способность клеток к пролиферации, - гены пролиферации, а также гены, регулирующие их общий метаболизм, - гены общего метаболизма. После формирования бластоциста преимущественно экспрессируются тканеспецифические гены. В период перехода зародыша в стадию органогенеза включаются

органоспецифические гены, а к началу функционирования органов включаются гены специализированных клеток.

Таким образом, гены, контролирующие раннее развитие, функционируют лишь на определенных стадиях: до достижения клетками (тканями) конкретных этапов дифференцировки. Такие гены называются хроногенами. Кроме них, выделены switch-гены или геныпереключатели, например, синтеза эмбрионального коллагена на коллаген взрослого типа или синтеза эмбрионального гемоглобина на фетальный гемоглобин.

Гены раннего развития

К настоящему времени идентифицированы многие гены и целые генные семейства, играющие главную роль в раннем развитии. В их числе - гены эмбрионального развития.

Большинство этих генов отвечают за выработку белков, называемых транскрипционными факторами, - они контролируют транскрипцию мРНК путем связывания специфических регуляторных участков на ДНК и образования ОИК (см. выше). Эти факторы могут активировать или подавлять экспрессию генов, контролируя гены, участвующие в координации каскада эмбриологических процессов, таких, как сегментация, индукция, миграция и дифференцировка, а также гены, регулирующие апоптоз (см. главы 9 и 10).

Очевидно, что эти процессы опосредуются факторами роста, которые индуцируют репликацию ДНК, а также клеточными рецепторами и др.

Среди генов эмбрионального развития отдельно выделено семейство эмбриональных генов или генов НОХ. Они образуют кластеры (пучки) генов: НОХ1-НОХ4 или пучки А, В, С, D. Поэтому их называют гомеобоксными генами, в которые входят пучки из 11 генов (пучок А) или из 9 генов (пучки В, С и D), локализованных в хромосомах 7p,17q, 12q и 2q соответственно. Гены НОХ имеют 180 н.п. Они кодируют транскрипционные факторы осевой дифференцировки эмбриона, отвечают за метамерное строение тела, формирование позвоночника, ребер и других осевых структур.

Следующее семейство генов эмбрионального развития - это спаренные гены или гены РАХ. Они кодируют полипептиды, включающие 180 аминокислот. Всего известно 8 РАХ-генов.

Мутации этих генов лежат в основе ряда наследственных заболеваний. Например, мутация гена РАХ-3 обуславливает аутосомно-

доминантный синдром Ванденбурга (глухота, гетерохроматия радужки, белая прядь волос надо лбом), а мутация гена РАХ-6 лежит в основе аниридии.

К следующему семейству генов эмбрионального развития принадлежат гены цинковых пальцев. Эти гены кодируют факторы транскрипции, представленные белками с мотивами (см. главу 8). Они расположены между двумя отдельными цистиновыми остатками, образующими комплекс с ионами цинка, похожий на палец. Мутации этих генов приводят к наследственным заболеваниям. Например, мутация в гене GLI3 (локус хромосомы 7) вызывает синдром Грейга (краниосиндактилия), а мутации в разных локусах хромосомы 11 обуславливают нарушение развития почек и аномалии половой дифференцировки.

Также отдельно выделяют семейство из 30 генов эмбрионального развития, кодирующих факторы транскрипции, - это семейство SOX. Все гены данного семейства продуцируют белки, имеющие гомологию в ДНК-связывающем домене. Они локализованы в хромосоме 3 (SOX2), X-хромосоме (SOX3), хромосоме 6 (SOX4) и хромосоме 17 (SOX9). Эти гены регулируют процессы дифференцировки различных отделов мозга и костей лицевого черепа. Их мутации проявляются уже в антенатальном периоде развития и нередко являются причинами тяжелых аномалий мозга и ранней эмбриональной гибели.

В свою очередь, мутация гена SOX9 ведет к постнатально диагностируемой кампомелической дисплазии.

Уровни регуляции синтеза белковых продуктов онтогенеза

Анализируя молекулярно-генетические и биохимические процессы онтогенеза, связанные с синтезом белковых продуктов, можно выделить следующие уровни их регуляции.

Претранскрипционный уровень

На этом уровне регуляция происходит путем изменения количества копий конкретного гена, что может привести к изменению количества белка в клетке и нарушению хода онтогенеза. Причинами этих событий являются простые и множественные дупликации, амплификации или делеции гена. В частности, в случае делеции гена ее крайним проявлением будет полная утрата функции гена и в клетке, находящейся в гомозиготном состоянии, будет отсутствовать белок, контролируемый данным геном. Если это крайне необходимый для организма белок, то подобный вариант всегда будет рассматриваться

как летальный, проявляющийся остановкой онтогенеза и самопроизвольным прерыванием беременности (см. главу 16).

Таким образом, в результате мутации на претранскрипционном уровне изменяется генная регуляция, что ведет к остановке (либо нарушению) синтеза конечного белкового продукта с соответствующими последствиями для организма зародыша и эмбриона.

Транскрипционный уровень

В этом случае регуляция осуществляется на уровне синтеза мРНК. В ходе транскрипции ДНК происходит считывание не только кодирующих (экзоны), но и некодирующих (интроны) частей молекулы, а также последовательностей, примыкающих к экзонноинтронной структуре. Все эти части образуют транскрипционную

единицу.

Существует возможность образования генетических дефектов в любой точке транскрипционной единицы, а также в самих регуляторных белках, что приведет к нарушению транскрипции всего гена и изменит количество синтезируемого белкового продукта. При этом предполагается, что участки транскрипционных единиц, не относящиеся к кодированию белка, играют важную роль во взаимодействии с белками, определяющими транскрипционные свойства гена.

Уровень процессинга и сплайсинга мРНК

В клеточном ядре первичный продукт транскрипции (высокомолекулярная про-мРНК) превращается в зрелую мРНК. Сначала растущая цепь про-мРНК взаимодействует с белковыми глобулами-информомерами, образуя *полисомоподобные структуры*.

Равномерно распределенная по поверхности информомеры промРНК подвергается действию ферментов процессинга, для которого известны два механизма: *внешний*, удаляющий последовательности, прилежащие к экзонно-интронной структуре, и *внутренний*, выщепляющий интроны и обеспечивающий сшивание (сплайсинг) экзонов в единую молекулу мРНК.

Также показано, что в ходе процессинга с помощью определенных ферментов осуществляется добавление полиадениловых участков к 3'-концу мРНК и метилированных оснований к 5'-концу мРНК.

Таким образом, нарушения процессинга и сплайсинга мРНК могут обусловить разные нарушения синтеза белковых продуктов онтогенеза вплоть до его остановки.

Уровень транспорта мРНК

В ходе транспорта зрелой мРНК в цитоплазме клетки она взаимодействует с РНК-связывающими белками, образуя свободные информосомы (комплексы мРНП). В их состав входят маскирующие и репрессорные белки, не способные поддерживать синтез белка. Комплексы мРНП преобразуются в *полисомные структуры*, способные поддерживать синтез белка. Это преобразование сопровождается удалением маскирующих и репрессорных белков и связыванием активированных белков, включая некоторые факторы трансляции. Оно завершает процессы, находящиеся под контролем транспортного уровня регуляции. Нарушение регуляции на уровне транспорта мРНК может произойти в результате дефектов любого из компонентов клеточного аппарата, осуществляющего такой транспорт, что приведет к остановке или нарушению синтеза белковых продуктов.

Уровень трансляции

Регуляция трансляции осуществляется непосредственно на уровне синтеза белковой молекулы. Известны три стадии трансляции: инициация, элонгация и терминация. Для их осуществления требуется присутствие множества специальных белковых факторов, например для стадии инициации необходимо не менее десяти таких факторов.

Кроме того, в составе молекулы мРНК имеются нетранслируемые последовательности нуклеотидов, расположенные на 5'-конце и 3'-конце. Считается, что они принимают участие в присоединении мРНК к рибосомам, клеточным мембранам, факторам трансляции, определяют стабильность и срок жизни самой молекулы мРНК. Например, делеция АУ-последовательности в 3'-нетранслируемом конце мРНК ведет к увеличению концентрации мРНК, увеличению продолжительности жизни этой молекулы, накоплению белка, стимулирующего деление фибробластов кожи и образование опухолей, а изменение первых кодонов 5'-области гена, определяющее сигнальную последовательность белка-тубулина, также изменяет время жизни мРНК. В целом наличие нетранслируемых последовательностей мРНК имеет большое значение для стабильного синтеза белка и, следовательно, нормального течения онтогенеза.

Один из способов регуляции на уровне трансляции - это образование вторичных структур в виде шпилек в районе иницирующего трансляцию кодона АУГ (верхняя часть шпильки - это петля из неспаренных оснований). Данный кодон блокирует трансляцию.

Имеются также регуляторные, связывающиеся с кодоном АУГ, белки (например, белок S7), которые, находясь в избытке, сами блокируют трансляцию. Кроме того, нарушения регуляции на уровне трансляции могут возникнуть, если в результате мутации в молекуле мРНК появится бессмысленный (модулирующий) кодон, для которого нет соответствующей тРНК, или ее концентрация сильно уменьшена. В этом случае синтез полипептидной цепи остановится либо скорость синтеза будет резко снижена из-за малой скорости включения аминокислоты (которой соответствует тРНК), что приведет к уменьшению количества белка.

Помимо указанных причин, регуляция трансляции зависит от условий окружающей клетку среды (например, рН ооцита равна 6,9, а рН зиготы - 7,4) и условий клеточного метаболизма (например, синтез белка-ферритина регулируется с помощью изменений концентрации ионов железа).

Посттрансляционный уровень

Это уровень посттрансляционной модификации белка или процессов созревания синтезированной полипептидной цепи. Такая цепь, прежде чем начать активно функционировать, подвергается ферментативным воздействиям. Среди них реакции:

- фосфорилирование-дефосфорилирование, обеспечивающее либо усиление транскрипции (за счет действия гормонов, стимулирующих синтез негистоновых белков), либо приводящее к угнетению трансляции и остановке синтеза белка;
- ацетилирование (ковалентная модификация), ведущее к развороту нуклеосомных частиц, в результате чего гистоны плохо связываются с ДНК;
- метилирование молекул ДНК и гистонов, входящих в структуру нуклеосом; оно усиливает основность (щелочность) гистонов и их связь с ДНК в составе хромосомы, что сказывается на репликации и транскрипции ДНК и нарушает процесс деспирализации нуклеосом перед началом синтеза и транскрипции;
- конформация или преобразование молекулы белка; например, нормальная изоформа прионного белка PrP^c преобразуется в патологическую изоформу PrP^{Sc} (см. главу 29).

Таким образом, разные нарушения регуляции генной активности могут изменить количество белкового продукта на любой из стадий его созревания или модификации. Например, если в ходе созревания полипептидной цепи к ней добавятся аминокислотные остатки или

она их утратит, то обязательно изменится функциональная активность или уменьшится количество созревшего белка.

Другие уровни регуляции

К другим уровням регуляции синтеза белковых продуктов онтогенеза может быть отнесено действие химических индукторов генной активности, например фенobarбитала, холестерина, гормонов и других веществ, вызывающих селективную модуляцию белков, контролирующую транскрипцию генов.

Немаловажное значение имеют соотношения гормональных и иммунных реакций в организмах беременной женщины и плода, что активно влияет на формирующиеся у плода главные регуляторные и защитные системы. При этом речь может идти о нарушениях регуляции секреции гормонов, факторов роста и нейромедиаторов, т.е. самих сигнальных молекул (см. главу 8).

Ангиогенез как механизм онтогенеза

С физиологической точки зрения, выделяют васкулогенез, который характерен для эмбриогенеза и начинается из стволовых клеток (см. главу 17), и ангиогенез, который сопровождает процессы заживления ран, овуляцию в женском организме, а также вызывает ряд патологических процессов, начинающихся из эндотелиальных клеток.

В ходе ангиогенеза обеспечивается формирование новой сети кровеносных сосудов из сосудов предшествующей ей сети. Благодаря этому клетки, ткани, органы и системы получают кислород, питательные вещества и энергию, обмениваются сигнальными молекулами, утилизируют продукты обмена веществ, т.е. ангиогенез - это один из обязательных механизмов онтогенеза, направленный на поддержание стабильности гомеостаза и целостности структур организма.

Кровеносные сосуды различаются по размерам, морфологии, составу и функциям.

Изнутри они выстланы эндотелиальными клетками, которые находятся в прямом контакте с кровью и обладают множеством функций, синтезируя, например, такие факторы, как тромбомодулин, ингибитор тканевого фактора (TF), ингибитор активатора плазминогена тканевого типа (t-PA), мультимерный фактор Виллебранда (vWF) или фактор адгезии и агрегации тромбоцитов и др. Кроме того, клетки эндотелия способны направлять клетки иммунной системы к лимфоидным органам и специфическим участкам ткани при их

воспалении. Мембраны эндотелиальных клеток избирательно проницаемы для белков, регулирующих свертываемость крови.

Снаружи кровеносные сосуды контактируют с базальными мембранами и внеклеточным матриксом клеток соединительной ткани (перипиты, фибробласты), гладкомышечных, жировых клеток.

В процессе ангиогенеза принимают участие не менее 20 биологически активных молекул, относящихся к проангиогенным факторам.

Проангиогенные факторы человека (по Луценко С.В. и соавт., 2004) следующие.

- Ангиогенин.
- Del-1-protein.
- Факторы роста фибробластов: aFGF (кислый), bFGF (основной).
- Фоллистатин.
- Колонистимулирующий фактор (GM-CSF).
- Фактор роста гепатоцитов (HGF).
- NIV-Tat.
- Интерлейкин-3 (IL-3).
- Интерлейкин-8 (IL-8).
- Лептин.
- Мидкин.
- Плацентарный фактор роста (PLGF).
- Тромбоцитарный фактор роста эндотелия (PD-ECGF).
- Тромбоцитарный фактор роста (PDGF).
- Плейотрофин (PTN).
- Пролиферин.
- Трансформирующий фактор роста-альфа (TGF-альфа).
- Трансформирующий фактор роста-бета (TGF-бета).
- Фактор некроза опухоли (TNF-альфа).
- Эндотелиальный фактор роста (VEGF).

Фазы ангиогенеза

Ангиогенез протекает в две фазы: активация и становление. В первой фазе наблюдается индукция роста кровеносных капилляров в ответ на ангиогенный стимул, поступивший из среды, окружающей клетку. Эта фаза включает четыре стадии: *первая* - стимуляция эндотелиальных клеток факторами роста ангиогенной активности; *вторая* - дестабилизация предшествующего кровеносного сосуда в результате ретракции адвентициальных клеток и перицитов; *третья* - локальная деградация базальной мембраны предшествующего кровеносного сосуда и ближайшего внеклеточного матрикса в результате

секреции эндотелиальными клетками протеолитических ферментов; *четвертая* - миграция эндотелиальных клеток в интерстициальное пространство, что сопровождается клеточной пролиферацией. Именно во второй фазе происходит преобразование мигрирующих эндотелиальных клеток в капилляроподобные структуры с формированием зрелых капилляров и инициацией потока крови. В этой фазе происходят:

- снижение миграционной и пролиферативной активности клеток эндотелия;
- восстановление базальной мембраны вновь образованных кровеносных капилляров;
- завершение интеграции клеток соединительной ткани в сосудистую стенку;
- организация кровеносных капилляров в сосудистую сеть.

Интенсивность, периодичность и контроль ангиогенеза

В нормально функционирующем организме ангиогенез протекает с низкой интенсивностью, поддерживается на низком уровне и, как правило, носит периодический и кратковременный характер. Контроль ангиогенеза обеспечивается основными регуляторными и защитными системами организма, поддерживающими баланс между его позитивными и негативными регуляторами.

От ангиогенеза зависят заживление ран, овуляция и эмбриогенез, а также развитие ряда патологических процессов. В их числе артриты, атеросклероз, ангиофибромы, гемангиомы, гранулемы, глаукома, диабетическая ретинопатия, ожирение, псориаз, синдромы Ослера-Вебера и Хиппеля-Линдау, склеродермия, солидные опухоли, трахома и др. (Луценко С.В. и соавт., 2004).

Особенно важную роль ангиогенез играет в канцерогенезе (см. главы 17 и 25).

ЭТАПЫ, ПЕРИОДЫ И СТАДИИ ОНТОГЕНЕЗА

Этапы онтогенеза

Выделяют два этапа: внутриутробный (антенатальный) и внеутробный (постнатальный). Первый этап - это время от момента слияния двух родительских гамет до момента рождения ребенка, включающее *герминативный период* (стадия зиготы), *эмбриональный*

период (стадия бластулы - образование однослойного зародыша и стадия гастролы - образование трехслойного зародыша) и *фетальный (плодный) период* - формирование первичного фенотипа.

Во второй половине внутриутробного этапа выделяют *пренатальный период* (время с 28-й недели беременности и до начала родов) и следующий за ним *интранатальный*

период (время от начала родовой деятельности до момента рождения ребенка). Главной целью внутриутробного этапа является контролируемая генетической программой развития подготовка антенатальных функциональных систем организма (на месте будущих постнатальных систем) к конкретным условиям внешней среды, встреча с которыми предстоит ребенку сразу после рождения.

Второй этап - это время от момента рождения до момента смерти организма, включающее ранний, средний и поздний периоды. Ранний период - это первые два года жизни или время приобретения организмом структурной и функциональной зрелости. В самом начале раннего постнатального развития выделен *неонатальный период* (время с момента рождения по 8-й день жизни ребенка). Объединенные вместе пренатальный, интранатальный и неонатальный периоды составляют *перинатальный период* (с 28-й недели беременности по 8-й день жизни ребенка). Такое специфическое подразделение введено в медицине в целях оптимального решения врачом задач педиатрии, так как ранний период постнатального онтогенеза - это относительно быстрая смена многих функциональных показателей органов и систем развивающегося организма. Затем следуют средний и поздний постнатальные периоды (см. ниже).

Периоды антенатального этапа онтогенеза

Герминативный период

Герминативный период - время с момента оплодотворения яйцеклетки сперматозоидом до момента имплантации зародыша в стенку матки. По одним данным, это первая неделя беременности, по другим - первые 14-15 дней беременности. Во втором случае говорят о *периоде бластогенеза* или стадии бластоциста (зародышевый пузырек). В этом периоде основные морфогенетические процессы в зиготе сведены к активации генов, индуцирующих синтез белков, необходимых для раннего развития, а также к дроблению, рестрикции и детерминации бластомеров или тотипотентных (равно наследственных) клеток, начальной дифференцировке и формированию эмбрионального

трофобласта и внезародышевых органов.

Эмбриональный период

После стадии бластоциста зародыш называется эмбрионом, а период его развития - эмбриональным периодом. Это один из наиболее сложных периодов внутриутробного онтогенеза, занимающий время от момента имплантации до 6-8-й недели или даже до 12-й недели беременности.

В эмбриональном периоде начинаются и интенсивно протекают процессы органогенеза, рост клеток и их миграция, дифференцировка тканей и органов, а также осуществляется переход от гистотрофного питания зародыша к плацентарному питанию (кровообращению), чему способствует формирование внезародышевых органов.

Еще в конце герминативного периода энтодерма и висцеральный листок мезодермы зародыша образуют изнутри полость бластоциста и формируют желточный мешок, в котором накапливается белковая жидкость и осуществляется кроветворение (участвует в трофике через кровеносные сосуды). Образующаяся туловищная складка отделяет желточный мешок от тела зародыша. При выпячивании энтодермы и висцерального мешка мезодермы заднего отдела кишки формируется аллантаис, который постепенно начинает выполнять функцию питания, так как его сосуды врастают в ворсинки хориона, формируя аллантаохорион.

Кроме того, аллантаис осуществляет экскреторную функцию (в его полость частично выделяются продукты обмена веществ эмбриона). В результате срастания над зародышем амниотических складок возникают амниотическая и серозная оболочки. Амниотическая оболочка или амнион вырабатывает околоплодные воды, создавая благоприятную жидкую среду для эмбриона и плода. Она охватывает кровеносные сосуды, идущие от эмбриона к плаценте, потоки желточного мешка и аллантаиса и образует вместе с ними пупочный канатик.

Серозная оболочка вплотную прилегает к трофобласту и вместе с ним образует хорион, за счет которого возникает связь зародыша с материнским организмом. Хорион вместе с участком стенки матки образует плаценту, в которой перерабатываются и всасываются питательные вещества и осуществляются выделительная, дыхательная и защитная функции. На поверхности хориона имеются многочисленные ворсинки, увеличивающие площадь соприкосновения с материнскими тканями. Хорион вырабатывает гормоны, влияющие на половые железы (гонадотропины), - эта функция позволяет рас-

сматривать плаценту как железу внутренней секреции. У человека формируется гемохориальная или дискоидальная плацента. Таким образом, в раннем эмбриогенезе закладываются ряд провизорных (временных) органов. В ходе дальнейшего эмбриогенеза разные ткани и органы дифференцируются в разные фазы роста. При этом каждая часть тела приобретает определенные очертания - это морфогенез. Процессы морфогенеза в основном завершаются к началу 9-10 нед беременности.

Плодный период

После 6-8 нед беременности зародыш называется плодом, а весь период его развития до рождения (9-40 или даже 12-40 нед беременности, называется плодным (фетальным) периодом. В этом периоде уже завершён морфогенез внутренних органов, но продолжается гистогенез или тонкая дифференцировка тканей. При этом обеспечивается снабжение плода кислородом и питательными веществами из крови матери через плаценту. В начале плодного периода заканчивается формирование лица, из пуповины в брюшную полость втягиваются петли кишечника, исчезают сомиты, жаберные дуги и хвост, т.е. плод приобретает облик человека. С этого времени идет «дозревание» тканей и увеличение органов в объеме. К концу 12 нед беременности завершается формирование кожи (она теряет прозрачность и покрывается пушковыми волосами) и мышечной системы (плод начинает двигаться).

Максимальный линейный рост плода приходится на 20 нед беременности, когда скорость роста достигает 5 см в неделю. Наибольшее увеличение массы тела плода приходится на последние 8 нед беременности, когда масса плода удваивается, а темпы роста замедляются.

В ранние сроки фетального периода рост плода в основном определяется его генотипом и контролируется генотипом материнского организма, а в середине и конце этого периода - еще и поступлением кислорода и питательных веществ через плаценту. При этом рост плода мало зависит от действия гормонов, хотя синтез собственного соматотропного гормона начинается уже в конце первого триместра беременности.

Следует еще раз подчеркнуть, что на антенатальном этапе онтогенеза (равно как на постнатальном этапе) материнский и отцовский геномы взаимодействуют не только между собой, но и с факторами внутренней и внешней среды растущего организма, являющимися пусковыми причинами его развития. Такое состояние принято

называть внутренним и внешним средовым окружением организма (генотипа). При этом внутреннее окружение организма зародыша, эмбриона и плода в большей степени формируются генотипом и фенотипом организма матери и в меньшей степени - генотипом и фенотипом организма отца. Вместе с тем, оно тесно связано с наследственной отягощенностью родителей, их соматическим статусом, состоянием родовых путей беременной, готовностью этих путей к родам и другими факторами. Например, установлены четкие различия во внутриутробном развитии генетически идентичных монозиготных (монохориальных) близнецов, имеющих разные площади бассейнов плацентарного кровообращения. В свою очередь, внешнее окружение организма зародыша, эмбриона и плода - это также его связь с действием факторов внешней среды, таких, как условия и образ жизни родителей, характер их питания, этнические особенности и т.д.

Периоды постнатального онтогенеза

Последовательно рассмотрим преемственное (хотя и несколько условное) становление конкретных функций и навыков организма в его взаимодействии с факторами среды.

Среди периодов постнатального онтогенеза выделяют следующие:

- Первые 2 ч жизни. В это время организм ребенка начинает освобождаться от биологически активных веществ, осуществлявших регуляцию жизнеобеспечения плода во время родов (так называемый материнский коктейль). Действия факторов (сигналов) окружающей среды приводит к «обнулению» дородовой программы. В их числе: гравитация, световые, звуковые, тактильные раздражители, а также сигналы, поступающие от легких, сердца, сосудов и желудочно-кишечного тракта.
- 2-12 ч жизни. Период, когда наблюдается «феномен прощания с внутриутробными способностями» (удерживать голову, проследить глазами, копировать движения матери, врача) или так называемый имитационный период.
- Первая неделя жизни. Это время первичной настройки жизненно важных функций ребенка, проявляющихся в новых условиях окружающей среды: начало и стабилизация работы органов дыхания, кровообращения и пищеварения, включая функции активного сосания, жевания, глотания и переваривания пищи.

Одновременно у ребенка утрачиваются врожденные автоматизмы сосания и шаговый.

- 2-12 нед жизни. Это первый период обучения ребенка после рождения, характеризующийся относительной стабилизацией жизненно важных функций и адаптацией к условиям окружающей среды. В это время увеличивается масса мозгового вещества, в нем происходит интенсивное аксоно-дендритное ветвление и формируются новые синаптические связи между нейронами. Ребенок учится видеть, слышать, следить и следовать глазами за увиденным и услышанным.
- 3-18 мес жизни. Это период первичного развития воспринимающей (сенсорной) системы или стадия развития двигательных навыков, необходимых для активных контактов ребенка с окружающей средой. Это время поиска глазами матери или поиска игрушки; кисть руки уже схватывает, рука тянется в рот. Начиная с 5-6 мес жизни, ребенок сидит, гулит, издает звуки, отражающие его эмоции, берет предмет и рассматривает его, различает людей, любимые и нелюбимые игрушки. В это время последовательно осваиваются: активное видение и слух, держание головы, ползание, сидение, стояние, хождение, понимание обращенной речи, сознательное произношение отдельных слов; развивается и дифференцируется шаговый автоматизм в виде

высвобождения движений рук и ног от положения головы, движений ног от положения рук.

- 1,5-3 года жизни. Это время приобретения первого персонального опыта. Для него характерны: осознанная фразовая речь, формирование межполушарной асимметрии мозга и возникновение доминантного полушария. Развивается импрессивная и экспрессивная речь. Появляется социальное общение и формируются коммуникативные функции. Ребенок различает и дифференцирует реальные предметы и события от их символов. Одновременно у ребенка угасает активность сосательного автоматизма, возникают первые впечатления (память о них нередко сохраняется на всю жизнь), дифференцируется представление о собственном «Я», начинается ограничение себя от окружающих людей, определяется профиль будущих отношений с родителями, «чужими» взрослыми, сверстниками и животными. В мозге завершается формирование двигательных и анализаторных центров, отбираются наиболее эффективные межнейронные контакты.
- 3-6 лет жизни, или период дошкольного возраста. Характерны более четкие движения. Создаются индивидуальный двигательный облик, позы, мимика, жесты. Совершенствуется работа анализаторов (зрительного, слухового, обонятельного, вкусового, кожной чувствительности). Формируются личный опыт восприятия, индивидуальная оценка окружающего, а также отдельные черты характера. Улучшается крупная моторика ног, ребенок учится подпрыгивать сначала на двух, а затем поочередно на левой и правой ноге. В конце этого периода основные системы и центры мозга ребенка готовы к началу школьного обучения и интенсивному пополнению запаса знаний и навыков. Развивается мелкая моторика кисти, окончательно разобщается шаговый автоматизм; функции рук освобождаются от влияния ног. Создаются условия для овладения навыками письма.
- После 6-7 и до 16-18 лет жизни, или период школьного возраста. Это время усвоения программных знаний, определения навыков абстрактного мышления, формирования собственного образа мыслей. Ребенок становится членом коллектива, учится согласовывать личные и общественные интересы. Определяются духовные качества личности. В рамках школьного возраста после 11-13 лет жизни выделен подростковый (пубертатный) период или период полового созревания. В это время изменяется внешний облик ребенка, происходят серьезные перестройки обмена веществ, эмоционального фона и поведения.
- После 16-18 и до 55-60 лет жизни, или период взрослого (зрелого) возраста. Характерны активная физическая, интеллектуальная, духовная, культурная, социальная и половая жизнь;
- После 55-60 лет жизни, или период пожилого возраста. Характерно постепенное угасание активности всех жизненных функций (процессов). Иногда возможен феномен диссоциации, кратковременно проявляющийся в признаках функциональной активности организма (см. ниже).

Таким образом, периоды постнатального онтогенеза характеризуются разной продолжительностью, быстро меняющейся в первые часы, дни, недели и месяцы жизни. Затем продолжительность периодов увеличивается до 1,5-3 и даже 10 лет жизни и, наконец, основной период жизни взрослого организма длится 40-50 лет, после чего наступает завершающий период, продолжительность которого редко превышает 10-15 лет.

Исключением являются долгожители, иногда достигающие возраста 110 лет.

Критические периоды онтогенеза и его нарушения

Критический период как понятие онтогенеза

Выше было отмечено, что в ходе онтогенеза у организма появляются новые функциональные возможности и навыки на фоне угасания и утраты старых, а пусковыми причинами этих изменений (наряду с потенциалом генетической программы) служат факторы окружающей среды.

Периоды перестройки функций и навыков организма называются критическими периодами онтогенеза. Они оказались чувствительными к действию неблагоприятных факторов среды, препятствующих нормальному развитию организма. При этом для каждой конкретной функции (навыка) генетически детерминирован оптимальный период ее становления и продолжительности. Иными словами, запуск критического периода определяется эндогенной готовностью организма к появлению, развитию и утрате конкретной функции (навыка), адекватной воздействию факторов окружающей среды. При этом потенциал такой функции может со временем истощиться. К примерам функций с оптимальной продолжительностью критических периодов онтогенеза относятся функции, приобретаемые в течение первого года жизни, когда ребенок непрерывно овладевает двигательными и перцептивными навыками: учится видеть и слышать, держать голову, сидеть, стоять и ходить. Причем каждый новый навык приобретается именно тогда, когда конкретная функция становится для организма наиболее значимой или приоритетной. Следует еще раз отметить, что ряд базовых функций (сосание, глотание, дыхание, жевание, зрение, кровообращение, пищеварение, слух) формируются еще во внутриутробном периоде, чтобы проявиться сразу после рождения и сохраниться до конца жизни. Однако некоторые базовые функции могут полностью утратиться к концу жизни, например зрение и слух.

Можно сделать вывод, что по истечении оптимального времени перестройки, определенного программой онтогенеза для развития конкретной функции или навыка, соответствующая ей функциональная система организма «закрывается» для действия факторов среды независимо от того, получила она адекватное воздействие этих факторов или нет.

Таким образом, во время критического периода онтогенеза проявляется его первая закономерность - открытие ранее закрытой функциональной системы организма для контактов с окружающей средой, и система вновь приобретает способность к перестройке, после которой происходит ее стабилизация на относительно низком (по сравнению с первоначальным) энергетическом уровне. Эта закономерность универсальна как для нормального, так и для патологического развития функциональных систем организма. В известном смысле, она часто служит причиной резистентности к терапии, успех которой зависит от умения врача заставить эту систему открыться (дестабилизироваться) и вместо порочной вызвать нормальную функцию организма.

Второй закономерностью критического периода онтогенеза является обеспечение развития приоритетной функции (навыка) организма, требующее от него больших энергетических затрат на разных уровнях организации.

Однако быстрая мобилизация необходимых средств и веществ возможна лишь из резервов организма, образовавшихся за счет ранее созревших или параллельно развивающихся функциональных систем, которые в критические периоды онтогенеза оказываются менее защищенными и менее компенсированными (по сравнению с приоритетными функциями и навыками) и потому уязвимыми. Этот феномен называется «феноменом обкрадывания».

Например, сразу после рождения наблюдается интенсивное воздействие на организм ребенка непривычных для него условий внешней среды.

В ответ на их действие начинает интенсивно развиваться ЦНС, в которой происходят: энергичный рост массы нейронов, увеличение числа мембранных рецепторов, синтез нейромедиаторов и образование новых синапсов (см. главу 13). Все это идет за счет внутренних резервов организма в ущерб старым (приобретенным во внутриутробном периоде) функциям и навыкам, поэтому многие из старых функций быстро утрачиваются. В частности, у ребенка быстро исчезают врожденные способности удерживать голову и проследить глазами, а также врожденные автоматизмы сосания и шаговый.

Таким образом, наряду с «феноменом обкрадывания», сопровождающим развитие новых функций и навыков, старые функции (навыки) тормозятся и возвращаются к исходному (нулевому) уровню. Данный феномен был назван «феноменом обнуления».

Сочетание этих двух феноменов составляет сущность «функционального выража», происходящего в критический период перестройки онтогенеза. В критическом периоде перестройки может также развиваться «феномен диссолюции». Его смысл заключается в неполном редуцировании старых функций (навыков) организма, которые в заторможенном виде сохраняются в глубинах памяти и при неблагоприятных условиях среды могут проявиться вновь, что, безусловно, создаст энергетические и другого рода помехи для развития новых функций и навыков.

Установлено, что выраженность феномена диссолюции зависит от действия различных медиаторов. Так, адренолитики и холинолитики его подавляют, а дофаминергические и холинергические препараты, наоборот, стимулируют.

К критическому периоду онтогенеза также относится «феномен импринтинга» (см. главу 28); за ним скрываются глубокие биологические и физиологические закономерности, относящиеся к проблеме взаимодействия генотипа и среды (эпигеномная регуляция генной активности).

С неврологических и психогенетических позиций импринтинг - это генетически детерминированная, эндогенно сформированная (врожденная) способность поведения (следования, копирования), проявляющаяся в постнатальном онтогенезе в специфических условиях внешней среды, т.е. это взаимодействие некоего внутриутробно сформированного поведенческого стереотипа и конкретных средовых воздействий (трактовка импринтинга с генетических позиций дается в главе 4).

Следует отметить, что феномен импринтинга универсален для всех живых организмов, развивающихся по индивидуальным генетическим программам. Без импринтинга невозможно «предвидение организмом» основных внешних воздействий, с которыми он может встретиться в постнатальном онтогенезе. С другой стороны, у организма нет заранее выработанных средств для взаимодействия с будущими внешними воздействиями. Следовательно, благодаря импринтингу как одному из механизмов реализации генетической программы онтогенеза в конкретных условиях окружающей среды растущий организм последовательно осваивает новые функции и навыки, т.е. он «дорастает» до очередного критического периода развития, встречая на своем пути все новые и новые сигналы к этому (факторы среды).

Критические периоды перестройки внутриутробного онтогенеза

Во внутриутробном онтогенезе выделены критические периоды перестройки, смысл которых заключается не только в последовательной смене стадий развития зародыша, эмбриона и плода, но и в оценке чувствительности (ранимости) организма к повреждающему действию факторов среды. Историческими предпосылками для

выделения таких критических периодов послужили работы П.И. Броунова (1897), И. Швальбе (1906), К. Стокарда (1907; 1921) и П.К. Светлова (1937; 1960).

У человека выделяют два критических периода внутриутробного онтогенеза, которые впервые были предположены П.И. Броуновым.

По современным представлениям, для зародыша характерен I критический период. Это 6-9-й дни беременности, совпадающие во времени с периодом бластогенеза. В этот период зародыш реагирует на действие факторов среды по принципу «все или ничего», т.е. он либо гибнет, либо (в силу большой адаптационной способности) продолжает развиваться. В эмбриогенезе в целом по этой причине гибнут 35-50% зародышей, которые элиминируются путем спонтанных абортс. Для организма женщины такая беременность протекает с незначительной, как правило, малозаметной задержкой менструального цикла на несколько дней, сопровождающейся обильной и часто безболезненной кровопотерей после задержки.

В морфологическом материале абортс обнаруживаются генные, хромосомные или геномные мутации (в последнем случае до 80% всех мутаций). Эти мутации ведут к нарушениям развития или бластопатиям. К ним относятся: нарушения ориентации эмбриобласта в бластоцисте, пустые зародышевые мешки, гипоплазия или аплазия внезародышевых органов, имплантация зародыша в роге или у внутреннего зева матки, нарушение глубины имплантации, двойниковые пороки (полностью или частично неразделившиеся близнецы), сиреномиелия и циклопия, а также внематочная беременность.

Для эмбриона характерен II критический период. Это 3-6 нед беременности. Развившиеся в этом периоде нарушения называются эмбриопатиями. К ним относятся очаговые и диффузные нарушения формирования органов, заканчивающиеся гибелью (самопроизвольными выкидышами) 10% эмбрионов или рождением 3% детей с БАР и МАР. т.е. суммарно потери составляют 13% от всех зарегистрированных беременностей.

По данным генетиков, общий вклад нарушений I и II критических периодов внутриутробного онтогенеза в потери беременности дости-

гает 63-65% от общего количества зачатий, и только каждая третья беременность может считаться нормально протекающей. На этой основе был сделан вывод, что самопроизвольный выкидыш (аборт) является защитным природным механизмом, избавляющим организм женщины от генетически дефектных зародышей и эмбрионов.

Причинами эмбриопатий служат мутации хромогенов (см. выше), ведущие к нарушениям клеточной пролиферации и дифференцировки. Соответственно, при ускорении этих процессов развиваются прогероидные симптомы и заболевания, а при замедлении - гетерогенные тканевые дисплазии мозга, легких или почек.

Для эмбриопатий характерны: высокий удельный вес моногенных и хромосомных болезней (соответственно 3% и 1% новорожденных), несоответствие фенотипа генотипу (фенотипически девочка, генотипически мальчик), а также неполное фенотипическое проявление пороков развития. В последнем случае речь идет о выявлении у эмбриона с конкретным хромосомным синдромом всего двух-трех БАР, тогда как у ребенка с таким же синдромом количество БАР может достигать двадцати.

Указанные критические периоды эмбриогенеза совпадают во времени с периодами наиболее интенсивной дифференцировки клеток и тканей. В свою очередь, нарушения, развившиеся в следующем (плодном или фетальном) периоде, называются фетопатиями.

Критический период, характерный для плодного периода, отдельно не выделен, так как в это время в основном уже завершено структурное формирование внутренних органов и большинства систем организма и продолжается только их функциональное созревание.

Вместе с тем, в самом начале плодного периода (9-11 нед беременности) еще продолжается гистогенез кожной и мышечной систем организма. Поэтому в случае повреждающего действия факторов внешней среды в этих системах могут формироваться дефекты клеточной и тканевой структуры или дисплазии, а также БАР и МАР.

К фетопатиям относятся:

- истинные пороки развития, связанные с функциональной незрелостью органов плода: пороки мозга, легких, зубов, сердца (незаращение боталлова протока), половых органов (одноили двусторонний крипторхизм);
- вторичные пороки развития (гидроуретер или гидронефроз);
- ложные пороки нормально развившихся органов в связи с их альтеративным и альтеративно-продуктивным воспалением (гидроцефалия или порэнцефалия при токсоплазмозе);
- наследственные болезни обмена (НБО), реализующиеся на биохимическом уровне (их большинство) или уровне фенотипа плода (ахондрогенез и несовершенный остеогенез). Хотя суммарное влияние генетических факторов на патологию плода в 4-5 раз меньше такового у эмбриона, удельный вес этой патологии довольно значителен по объему. Например, если хромосомный дисбаланс у абортусов эмбрионального периода составляет 50%, то у абортусов плодного периода он достигает 10-12% (см. главу 16).

Наиболее частым нарушением плодного периода является задержка внутриутробного развития (ЗВУР) или (по старой терминологии) врожденная гипотрофия, частота которой, по данным ВОЗ, составляет в среднем 17% (колебания в разных странах от 2,9 до 39,0%). ЗВУР плода - это хроническое расстройство питания, сопровождающееся дефицитом массы тела по отношению к длине плода.

Дети со ЗВУР рождаются недоношенными в 24% случаев (недоношенный ребенок рождается при сроке 37 нед беременности и сроке гестации менее 36 нед), доношенными в 10,3-22,0% случаев или еще реже - переносными.

Согласно общепризнанной классификации, выделяют гипотрофический, гипопластический и диспластический варианты ЗВУР. Перинатальная заболеваемость детей с разными вариантами ЗВУР в 10 раз выше, а перинатальная смертность в 5 раз выше, чем у доношенных детей.

При первом и втором вариантах ЗВУР - это «маловесный для срока плод» с признаками или без признаков недостаточности питания соответственно. Причем недостаточность питания не сопровождается снижением массы тела плода относительно срока беременности и характеризуется признаками дистрофии: сухость, шелушение и снижение тургора кожи, тонкий подкожный жировой слой.

Диспластический вариант ЗВУР - это проявление большого числа генетически детерминированных синдромов (до 200 нозологий) или генерализованных внутриутробных инфекций (чаще вирусных), сочетающихся с БАР и МАР (их частота от 1,3 до 16,5%) и нарушениями телосложения. Для этого варианта ЗВУР нехарактерно нормальное течение внутриутробного онтогенеза, при нем не наблюдается гомеорез, но

постоянны нарушения гомеостаза, а также характерны поражение ЦНС и изменения иммунологической реактивности. В дальнейшем у таких детей наблюдается задержка психомоторного, физического и интеллектуального развития, часто развиваются церебральные параличи.

Как установлено, генетические причины ЗВУР плода могут быть связаны с нарушениями материнского генома и, в частности, однородительской изодисомией по хромосомам 11 и 16 материнского происхождения. В случае хромосомы 16 также выявляется плацентарный мозаицизм.

Критические периоды перестройки постнатального онтогенеза

Постнатальный онтогенез также насыщен критическими периодами перестройки, что особенно характерно для его начала.

Выделяемый после рождения организма критический период перестройки является таким еще и потому, что именно в это время его негативным эффектом служит торможение структурного и функционального созревания ЦНС в ответ на действие факторов внешней среды. При данном негативном эффекте имеет место следующее.

- Блокировка дендритного спраунинга и остановка развития нейронов на начальной стадии арборизации. Причинами служат: анте- и интранатальная гипоксия плода, последствия родовой травмы, вынесенные в постнатальный период, токсическое воздействие факторов эндогенной или экзогенной природы (в том числе материнского происхождения), наследственные и ненаследственные нарушения обмена, интранатальные и постнатальные сосудистые поражения мозга. В итоге формируются огрубленные нейроны, неспособные к созданию сети межнейронных связей (см. главу 13).
- Функциональный дефицит, соответствующий первым дням и неделям жизни, когда фиксируются (проявляются) неблагоприятные воздействия среды на плод, произошедшие в перинатальном и интранатальном периодах.

Критический постнатальный период у новорожденного и годовалого ребенка заполнен импринтинговыми событиями, связанными с новым для него наружным общением с матерью (сосательное поведение - захват соска, жевание, глотание), которое сформировалось внутриутробно под контролем мультиполярных нейронов ретикулярной формации ствола головного мозга, расположенных рядом с двигательным ядром тройничного нерва. Именно в это время (через 5-7 дней после рождения) начинается интенсивный дендритный спраунинг, осуществляются отбор и стабилизация наиболее эффективных межнейронных связей, а также стабилизация уровня

ганглиозидов в мозге, достигающая оптимальных значений в конце критического периода перестройки.

При повышении уровня ганглиозидов (гликолипидных рецепторов) у ребенка в дальнейшем может развиваться интеллектуальнопознавательная недостаточность, а при снижении их уровня - детский церебральный паралич (ДЦП). Во втором случае в мозге идентифицируются нейроны с огрубленным дендритным ветвлением, что служит диагностическим (прогностическим) признаком.

Другой пример - ФКУ, при которой метаболические нарушения вызывают повреждение мозговых структур и функциональные нарушения, если время нарушений совпадает с ранним постнатальным периодом перестройки.

Вместе с тем, если в раннем возрасте (первые 3 мес жизни) заблокировать образование вредных метаболитов, то грубого повреждения мозга не последует и функциональный дефицит не разовьется.

Особенности критических периодов онтогенеза

К особенностям критических периодов онтогенеза относятся:

- направленность критического периода;
- значимость (приоритетность) развивающейся функции и навыка;
- открытость развивающейся функции и навыка для действия факторов среды или способность организма к перестройке (переобучению) в соответствии с новыми условиями среды и требованиями возрастного периода онтогенеза;
- способность к импринтингу;
- возрастной нормативный (эталонный) комплекс признаков;
- сущность функционального виража (сочетание феноменов обкрадывания и обнуления);
- закрытие на относительно низком энергетическом уровне функций и навыков в конце периода перестройки;
- наличие или отсутствие отклонений от нормативного (эталонного) комплекса признаков; в первом случае - это нарушения хода онтогенеза;
- выраженность или отсутствие феномена диссоциации.

Основные факторы онтогенеза

Жизненный потенциал организма - это генетическая программа онтогенеза, обеспечиваемая непрерывным взаимодействием материнского и отцовского генных комплексов в составе генотипа при

постоянном участии факторов окружающей среды. Эта программа интегрирует и контролирует адекватное воздействию факторов среды развитие профиля и спектра молекулярно-генетических, биохимических и биофизических реакций в каждой клетке и организме в целом, обеспечивая формирование всех его признаков и гомеостаза в соответствии с возрастной изменчивостью.

Выделяют 6 основных факторов онтогенеза.

I. Материнский и отцовский геномы в составе генотипа организма.

Материнский и отцовский геномы в составе генотипа организма являются соответственно основной и дополнительной частями генетической программы его онтогенеза. При этом материнский геном обеспечивает наибольший вклад в зиготу: передает ей все ядерные и цитоплазматические элементы и связанную с ними большую часть генов (ядерных и митохондриальных). Отцовский геном обеспечивает меньший вклад в зиготу: передает ей только ядерные.

II. Генотип матери развивающегося организма.

Генотип матери развивающегося организма принимает прямое (непосредственное) участие в формировании его женского генотипа и фенотипа и не прямое (опосредованное) участие в формировании его мужского генотипа и фенотипа, являясь для них основным и

дополнительным обучающим (эталонным) комплексом соответственно, на основе которых генетическая программа онтогенеза развивающегося организма интегрирует и контролирует его формирование и функционирование на всех этапах, периодах и стадиях развития.

III. Окружение генотипа организма матери.

Окружение генотипа и фенотипа организма матери прямо связано с изменчивостью генотипа развивающегося организма в ходе его онтогенеза. Для внутреннего окружения характерна корреляция с:

- наследственной отягощенностью;
- возрастом;
- патологией беременности;
- бактериальными и вирусными инфекционными заболеваниями;
- соматическим статусом (метаболический, гормональный и иммунный профиль, неврологическое и психическое состояние);
- кровоснабжением и размерами матки;
- маточно-плацентарными особенностями;
- состоянием родовых путей и их готовностью к родам.

Для внешнего окружения организма матери характерна корреляция с:

- условиями и образом жизни;
- качеством и объемом поступающих в материнский организм продуктов питания и питьевой воды;
- приемом лекарственных препаратов;
- проведением рентгенодиагностических и другого рода процедур, связанных с воздействием на материнский организм физических и химических факторов;
- состоянием окружающей среды (атмосферное давление, влажность, загрязненность радионуклидами и химическими соединениями, кислотные дожди, магнитные бури, освещенность, температура, условия высокогорья);
- этническими особенностями.

IV. Генотип отца развивающегося организма.

Генотип и фенотип отца принимают прямое (непосредственное) участие в формировании генотипа и фенотипа и не прямое (опосредованное) участие в формировании его женского генотипа и фенотипа, являясь для них основным (эталонным) комплексом соответственно, на основе которых генетическая программа онтогенеза развивающегося организма интегрирует и контролирует его формирование и функционирование на всех этапах, периодах и стадиях развития.

V. Окружение генотипа отца организма.

Окружение генотипа организма отца опосредованно связано с изменчивостью генотипа развивающегося организма в ходе онтогенеза. Для внутреннего окружения характерна корреляция с:

- наследственной отягощенностью;
- возрастом;
- соматическим статусом (метаболический, гормональный и иммунный профиль, неврологическое и психическое состояние).

Для внешнего окружения характерна корреляция с:

- условиями и образом жизни;
- качеством и объемом продуктов питания и питьевой воды;
- приемом лекарственных препаратов;
- проведением рентгенодиагностических и другого рода процедур, связанных с воздействием физических и химических факторов;
- состоянием окружающей среды (атмосферное давление, влажность, загрязненность радионуклидами и химическими соединениями, кислотные дожди, магнитные бури, освещенность, температура, условия высокогорья);
- этническими особенностями.

VI. Действие факторов окружающей среды.

Действие факторов окружающей среды на генотип и фенотип развивающегося организма проявляется в биологических закономерностях и индивидуальных характеристиках его онтогенеза. При этом особая роль принадлежит развитию способностей (свойств) коры больших полушарий головного мозга развивающегося организма отражать (запечатлять) результаты действия факторов окружающей среды на основе широкой сети межнейронных связей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генетическая программа онтогенеза человека, сформированная на основе двух родительских геномов уникальна. Генотип организма типизирует развитие, обеспечивая реализацию видовой генетической программы по созданию фонда стабильных признаков вида на основе консервативной наследственности, а также индивидуализирует генетическую программу благодаря генетическому и фенотипическому полиморфизму, определяющему специфические признаки индивида. При этом возрастающая индивидуализация генетических влияний способствует увеличению многообразия генетических и фенотипических признаков.

Материнский и отцовский геномы в составе генотипа развивающегося организма иницируют, интегрируют (координируют) и контролируют молекулярную жизнь его клеток, тканей, органов и систем на основе постоянного межгеномного взаимодействия родительских генных комплексов и участия факторов окружающей среды.

Закодированная в генотипе развивающегося организма индивидуальная программа развития является главной молекулярногенетической, биохимической и биофизической основой (потенциалом). От содержания и величины этого потенциала зависят онтогенетическое здоровье, качество и продолжительность жизни организма.

Онтогенетическое здоровье базируется на геномном и протеомном здоровье, формирующем соматическую, психическую и репродуктивную составляющие части. Оно связано с сохранением баланса обмена веществ в ходе развития, стабилизации, угасания и утраты функций и навыков организма.

Нарушения онтогенеза сопровождаются структурными и функциональными отклонениями в развитии организма, следствием

которых является изменение стабильности обмена веществ, обусловленное генетическими и негенетическими причинами. Факторы окружающей среды выступают в роли сигналов к развитию нового качественного состояния организма (от нормы до болезни).

В критические периоды перестройки функций и навыков организма его возраст объединяет все регуляторные и защитные системы в единое целое, определяет преемственность, взаимосвязь и синхронность, интенсивность и продолжительность их функционирования. Важную роль в формировании нормальных и патологических признаков организма играет ангиогенез, являющийся одним из механизмов онтогенеза.

ГЛАВА 13 ОНТОГЕНЕЗ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО НАРУШЕНИЯ

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕРВНОЙ ТКАНИ

Морфологический субстрат

Нервная система организма интегрирует работу эндокринной, иммунной, мышечной, репродуктивной и других систем и является главной регуляторной системой (после молекулы ДНК), построенной на основе нервной ткани, - это нервные клетки (нейроны), обширная сеть нервных окончаний и клетки глии. Из нервной ткани сформированы головной и спинной мозг - это центральная нервная система.

Другие морфологические элементы нервной ткани - нервные узлы, сплетения, стволы, волокна и окончания - это периферическая нервная система.

Нейрон имеет тело и отростки: один аксон (передает молекулярную информацию) и один или несколько дендритов (принимают молекулярную информацию).

По количеству отростков нейроны делятся на *униполярные* (один отросток); *биполярные* (2 отростка), например нейроны сетчатки глаз или спирального ганглия внутреннего уха; *мультиполярные* (3 отростка и более) - большинство нейронов.

Нейроны имеют разную форму, например, среди нейронов коры головного мозга выделены звездчатые, веретенообразные, паукообразные, пирамидные и горизонтальные.

Специфическая особенность нейронов заключается в том, что в постнатальном онтогенезе они не делятся - их размножение происходит внутриутробно, и к моменту рождения организма создается необходимый резерв, включающий 150 млрд нейронов (так же, как резерв из 2000 яйцеклеток - см. главу 9). Подсчитано, что в среднем за 70 лет жизни утрачиваются (гибнут) только 3% нейронов (и около 20% яйцеклеток)*.

* Ответ на вопрос, зачем нужны резервные нейроны, дается в конце этой главы.

Обширная сеть нервных окончаний, пронизывающих все ткани и органы, представлена огромным количеством окончаний нервных волокон. По функциональному назначению эти окончания делятся на три группы: эффекторы, рецепторы и синапсы.

К эффекторам относятся двигательные (моторные) и секреторные окончания. Моторные заканчиваются в мышечных тканях моторными бляшками (аксоно-мышечные синапсы) - это окончания моторных ядер головного мозга и нейронов передних рогов спинного мозга.

К рецепторам относятся чувствительные окончания или концевые части дендритов, рассеянные по всему организму и воспринимающие внешние и внутренние средовые воздействия. Среди них выделяют механорецепторы, барорецепторы, хеморецепторы, терморецепторы и др. Рецепторы могут быть как свободными (состоят только из мелких окончаний осевого цилиндра), так и несвободными (имеют все компоненты нервного волокна). И те, и другие могут быть покрыты оболочками (инкапсулированные) или не покрыты ими (неинкапсулированные). Формы рецепторов разнообразны: пластинчатые и осязательные тельца, генитальные глыбки, температурные колбы, нервно-мышечные веретена.

Синапсы представляют собой соединения (контакты) между окончаниями аксонов и клетками-мишенями.

В составе синапса выделяют *пресинаптический полюс* (окончание аксона), контактирующий с аксоном, дендритом или телом другого нейрона, формирующего на своей поверхности *постсинаптический полюс*. Оба полюса покрыты мембранами (пре- и постсинаптические мембраны соответственно), которые содержат мукополисахариды. Между полюсами расположена *синаптическая щель*.

Терминальная часть аксона представляет собой тонкие нити или веточки с концами в виде пуговок или колечек, которые находятся на поверхности другого нейрона. Она содержит множество митохондрий и мелких пузырьков. Эти пузырьки выходят через пресинаптическую мембрану в синаптическую щель и поэтому называются *синаптическими пузырьками*. В них находятся нейромедиаторы (ацетилхолин, норадреналин, серотонин и др.). Число синапсов, приходящихся на 1 нейрон, достигает 10 тыс.

Синапсы делятся на *аксо-соматические* (аксон-тело), *аксодендрические* (аксон-дендрит) и *аксо-аксональные* (аксон-аксон). Могут встречаться синаптические гломерулы (1 аксон - 2 дендрита или

2 аксона - 2 дендрита). Общее количество синапсов у человека достигает 10^{14} .

Эффективность работы синапсов обширной межнейронной сети зависит от сохранения стабильности механизмов и времени прохождения нервных импульсов (см. ниже) и от числа контактов у одного нейрона. Неполноценные нейроны имеют меньше контактов и поэтому утрачиваются. Их функции переходят к полноценным нейронам.

Клетки нейроглии делятся на два класса: *микроглия* или глиальные макрофаги (обеспечивают фагоцитоз), и *макроглия* или глиоциты. Макроглия включает астроциты, олигодендроглиоциты и эпендимациты.

Астроциты делятся на два типа: *плазматические* (расположены в сером веществе мозга, богаты митохондриями - они выполняют трофическую и обменную функции) и *волокнистые* (расположены в белом веществе мозга, выполняют опорную функцию).

Эпендимациты выстилают желудочки головного мозга и спинномозговой канал, где выполняют разграничительную и опорную функции, а некоторые из них - еще и секреторную функцию. Например, клетки субкомиссурального слоя задней комиссуры выделяют секрет, участвующий в регуляции водного обмена в желудочках мозга.

Самая многочисленная группа глиальных клеток - олигодендроглиocyты.

Они окружают тела нейронов, входят в состав оболочек нервных волокон и окончаний, принимают участие в их регенерации и дегенерации, восприятии и проведении нервных импульсов, а также выполняют трофическую и защитную функции.

Функциональный субстрат

В функционировании нервной системы принимают участие нейроны и межнейронные связи, сформированные на основе обширной сети нервных окончаний, пронизывающих все тело и внутренние органы человека. В зависимости от выполняемой функции выделяют *чувствительные нейроны* (рецепторные или аффлекторные), *ассоциативные нейроны* (вставочные) и *эффлекторные нейроны* (двигательные или моторные). Первые генерируют нервные импульсы, вторые (их достаточно много) связывают между собой чувствительные и эфффлекторные нейроны, а третьи проводят нервные импульсы на ткани рабочих органов (мышцы и железы).

Кроме этих нейронов выделяют *секреторные нейроны*, например крупные нейроны ядер гипоталамуса. Их цитоплазма содержит гранулы и капли секрета, включающего белки, липиды и полисахариды.

Физиологическое устройство нервной системы включает цереброспинальную соматическую часть (иннервирует все тело, кроме внутренних органов, сосудов и желез) и вегетативную автономную часть (иннервирует внутренние органы, сосуды и железы). Основное отличие соматической части от автономной заключается в наличии у последней вместо одного двух афферентных нейронов.

Центральная нервная система, макро- и микросистемы

Центральная нервная система (цереброспинальная часть) - это головной мозг или сверхсистема, объединяющая макросистемы и микросистемы организма, которые сформировались в ходе эволюции на основе обширной сети межнейронных связей.

Макросистемы - это морфофункциональные образования высокого уровня.

Основной макросистемой является кора больших полушарий головного мозга, которая делится на новую (96% всей коры), древнюю, старую и промежуточную.

Новая кора представлена слоем серого вещества толщиной 3-5 мм. Она содержит около 15 млрд мультиполярных нейронов, и в ней выделяют 6 этажей (пластинок): верхний молекулярный, наружный зернистый, пирамидный, внутренний зернистый, ганглионарный и полиморфный.

В коре два полушария. В каждом полушарии имеются борозды (центральная, латеральная, теменно-затылочная и др.), которые разделяют их на доли (лобная, височная, теменная и затылочная), и многочисленные извилины. В этих частях коры и под ними расположены корковые, корково-подкорковые, подкорковые (стволовые) сети нейронов, отличающиеся особенностями строения (цитоархитектоника) и расположением отростков нейронов (миелоархитектоника).

Функциональная роль коры огромна. Благодаря ассоциативным связям между всеми ее образованиями она интегрирует и контролирует все процессы жизнедеятельности организма. В частности, задние отделы коры принимают молекулярную информацию, а передние и средние отделы ее анализируют (обрабатывают) и организуют сложные формы поведения человека.

К высшим психическим функциям головного мозга относятся: гнозис (узнавание), мышление, память, праксис (целенаправленность действия), речь и др.

К основным нервным функциям относятся: двигательные, интеллектуальные, коммуникативные, перцептивные и др. Другие, меньшие по объему и значению макросистемы, - это подкорковые образования головного мозга, функционирование которых интегрирует кора больших полушарий.

Ствол головного мозга включает центры жизненно важных функций, как то: поддержание общего тонуса и контроль потребностей и мотивации организма, побуждение его к действию (голод, жажда, оборона, речь, стресс и др.), а также другие функции.

Особая роль в регуляции функций принадлежит лимбической макросистеме, основными образованиями которой являются гипоталамус (гиппокамп) и миндалевидное ядро, а также структуры, условно относящиеся к другим морфофункциональным системам, включая подкорковые и подкорково-корковые образования (поясная и грушевидная извилина, передние ядра таламуса, обонятельные луковицы, тракт и бугорок, гипоталамус, ретикулярная формация, участки лобных, височных и теменных долей коры больших полушарий). Иными словами, это те образования, которые тесно связаны между собой и другими морфофункциональными системами, но в составе лимбической макросистемы они интегрируют вегетативные функции с высшими поведенческими реакциями. Среди этих функций: адаптационное воздействие окружающей среды на рецепторный и синаптический аппарат, бодрствование, инстинкты, мотивации, мочеиспускание, обмен веществ, потоотделение, слезотечение, слюноотечение, сон, терморегуляция, тонус сердечно-сосудистой и эндокринной систем, дефекация, эмоции и др.

Спинной мозг - это второй по значимости компонент цереброспинальной соматической части нервной системы. Эта макросистема обеспечивает прохождение нервных импульсов через проводящие пути, восходящие к коре головного мозга (афферентные или центростремительные пути), и пути, нисходящие от него к ядрам спинного мозга (эфферентные или центробежные пути). Здесь также имеются собственные проводящие пути, связывающие между собой различные сегменты спинного мозга.

Микросистемы в отличие от макросистем регулируют только определенные отдельные функции.

Вегетативная нервная система

Вегетативная нервная система является автономной макросистемой, объединяющей две микросистемы: симпатическую и парасимпатическую. Первая тормозит, а вторая усиливает проведение молекулярной информации. К первой относятся тораколюмбальные ядра, ко второй - краниобульбарные и сакральные ядра.

Вегетативная нервная система имеет центральные и периферические отделы. *Центральные отделы* включают ядра среднего и продолговатого мозга, ядра боковых рогов грудных, поясничных и сакральных сегментов спинного мозга, а к периферическим отделам принадлежат нервные стволы, узлы, сплетения, волокна и окончания.

В сплетениях расположены нейроны с большим количеством ядер (до 15-ти в одной клетке). Эти ядра ограничены от цитоплазмы двумя мембранами, расположенными на расстоянии 200 А друг от друга и имеющими поры. В каждом ядре находятся 2-3 ядрышка с высоким содержанием РНК, что, например, характерно для клеток сетчатки глаз, предстательной железы и шейки матки.

Периферическая нервная система

К периферической нервной системе (помимо периферических структур вегетативной системы) относится нервная ткань в составе нейронов головного мозга, чувствительных ганглиев спинного мозга и идущих от них нервных узлов, стволов, волокон и окончаний.

Ганглии спинного мозга состоят из скоплений псевдоуниполярных нейронов, одетых в соединительнотканную капсулу, тонкие прослойки которой проникают в паренхиму узла, образуя остов с проходящими в нем сосудами. Их аксоны и дендриты образуют белое вещество спинного мозга - это преимущественно миелиновые волокна.

Нервные стволы или собственно нервы состоят из пучков нервных волокон, представляющих собой аксоны и/или дендриты (так называемые осевые цилиндры), сверху покрытые соединительнотканными капсулами (оболочками). Если одна оболочка покрывает одно нервное волокно - это *эндоневрий*. Если в одну оболочку «одеты» несколько нервных волокон (у каждого свой эндоневрий) - это *периневрий* или 5-6 плотных чередующихся слоев клеток и тонких фибрилл. Если в одну оболочку «одет» весь нервный ствол - это *эпиневрий*, содержащий фибробласты, клетки макроглии, жировые клетки, кровеносные и лимфатические сосуды и нервные окончания.

Аксоны и дендриты нейронов могут образовывать *смешанные волокна*.

Нервные волокна покрыты либо миелиновыми, либо безмиелиновыми оболочками.

Сверху нервное волокно покрыто базальной мембраной, состоящей из двух слоев леммоцитов - клеток с овальными ядрами и вытянутой цитоплазмой (условно напоминают изоляционную ленту для электропроводки).

Миелиновые оболочки значительно толще безмиелиновых и имеют внутренний, прилегающий к осевому цилиндру (толстый) слой, состоящий из *шванновских клеток* (леммоциты, содержащие миелин - жироподобное вещество из липидов и белков).

Миелиновый слой - это цепочка из отдельных клеток в виде узловых сегментов (каждый сегмент представлен одним леммоцитом) и межузловых сужений - *перетяжек Ранвье* (границы между двумя леммоцитами).

Сразу за миелиновым слоем идет *внешний (тонкий) слой*, состоящий из леммоцитов, не содержащих миелина, и плотных коллагеновых фибрилл, не прерывающихся в перетяжках Ранвье.

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРООНТОГЕНЕЗА

Онтогенез нервной системы или нейроонтогенез - это генетически детерминированные структурные и функциональные преобразования нервной ткани с момента рождения до момента смерти организма. Этапы нейроонтогенеза соответствуют этапам общего онтогенеза и также представляют собой два параллельно идущих процесса: прогресс и регресс (см. предыдущую главу).

Нейроонтогенез начинается и продолжается антенатально, затем прерывается в перинатальном периоде на период родов, восстанавливается в раннем постнатальном этапе (после неонатального периода), продолжается и наиболее интенсивно протекает в первое десятилетие жизни. В это время нервная система проходит основной адаптационный период с момента начала структурного, а затем функционального созревания нервной ткани под действием факторов окружающей среды.

Созревание нервной ткани продолжается в течение длительного времени, хотя условно можно считать, что оно идет до тех пор, пока в нервной системе не начнутся сначала медленные, но постепенно

ускоряющиеся и, наконец, преобладающие инволюционные процессы. Например, известно, что желтый пигмент нейронов - липофусцин впервые появляется у ребенка 7-10 лет, и его нормальное содержание (типичное для взрослого организма) сохраняется до 30-летнего возраста, и только потом оно превышает нормативные значения.

Основные события антенатального этапа

Для антенатального этапа нейроонтогенеза характерны:

- миграция нейронов ПВО к местам своего назначения;
- начало роста аксонов к клеткам-мишеням и образование синапсов;
- начало роста дендритов и их ветвление. Эти процессы наблюдаются за несколько недель до начала родов и останавливаются в случае патологического действия факторов среды (см. гомеорез в главе 12);
- начало миелинизации нервных волокон и окончаний;
- глиальная дифференцировка, трофическое и иммунное обеспечение сформировавшихся структур нервной системы.

Формирование основных структур

Нервная ткань зародыша развивается на антенатальном этапе из дорсального утолщения эктодермы - *нервной пластинки*, которая прогибается и превращается в *желобок*, а затем замыкается в *нервную трубку*, обособляющуюся от кожной части эктодермы. Нервная трубка является эмбриональным зачатком всей нервной системы - это стадия нейруляции.

Начиная с 25-го дня беременности, головной конец нервной трубки последовательно проходит стадии трех и пяти мозговых пузырей.

На 3-м месяце беременности из мозговых пузырей образуются основные структуры головного мозга.

Первоначально головной мозг - это утолщенные стенки мозговых пузырей. Из них развиваются продолговатый, задний (мост и мозжечок), промежуточный (диэнцефальная область) и конечный мозг (ствол головного мозга и кора больших полушарий), а полости мозговых пузырей становятся полостями мозговых желудочков. Обращенная к полости внутренняя зона мозговых пузырей вместе с околожелудочковой зоной (стенки полости) называется перивентрикулярной областью мозга.

Утолщение стенок мозговых пузырей обусловлено форсированным размножением нейронов ПВО, их радиальной миграцией и размещением в краевой (наружной) зоне стенок мозговых желудочков - будущей коре больших полушарий. При этом краевая зона как бы отодвигается молодыми нейронами кнаружи, образуя слои субвентрикулярной зоны, в которой начинается и интенсивно протекает размножение глиальных клеток. В это время в краевой зоне уже прекращен митоз нейронов, она постепенно сужается и в ней формируется корковая пластинка, состоящая из нейронов определенной степени зрелости.

Краевая зона мозга вместе с корковой пластинкой образуют серое (корковое) вещество мозга - это поверхностные слои коры больших полушарий и коры мозжечка, а также

центральные ядра мозжечка и ядра ствола головного мозга в составе чувствительных, ассоциативных и двигательных нейронов. Одновременно с формированием серого вещества между корковой пластинкой с наружной стороны и субвентрикулярной зоной с внутренней стороны мозговых желудочков образуется промежуточная зона, в которой постепенно уменьшается количество нейронов и их место занимают нервные волокна, формирующие белое вещество головного мозга.

Нейроны серого вещества спинного мозга развиваются из нейробластов. На поперечном срезе спинного мозга - это внутренняя (центральная) часть, содержащая ядра передних и задних рогов в составе афферентных нейронов и пучковых клеток. Компоненты белого вещества спинного мозга - это его периферическая часть (на поперечном разрезе выделяется в виде буквы Н или «бабочки»).

Периферическая часть включает продольно ориентированные миелиновые волокна - это проводящие пути (передние, боковые и задние), связывающие между собой различные отделы нервной системы.

На 3-м месяце беременности из средних отделов нервной трубки формируются ствол мозга и ганглиозная пластинка. Нервная трубка дает начало трем слоям клеток: внутреннему (эпендима), среднему (мантия или плащ) и наружному (краевая вуаль).

Краевая вуаль - это отростки клеток, расположенных во внутреннем и среднем слоях.

В дальнейшем из эпендимы образуются глиальные клетки, а из мантии - нейробласты (предшественники нейронов) и спонгиобласты (астроциты и олигодендроциты).

Ствол мозга объединяет продолговатый, средний и промежуточный мозг, а также базальную часть конечного мозга.

В центре продолговатого мозга расположена ретикулярная субстанция (формация), распространяющаяся до промежуточного мозга и состоящая из мелких мультиполярных нейронов. Как макросистема ретикулярная формация связана с корой больших полушарий, корой мозжечка, гипоталамической областью мозга и спинным мозгом (см. выше).

Нейробласты передних столбов спинного мозга дифференцируются в моторные нейроны передних рогов, их аксоны выходят из спинного мозга и образуют его передние корешки.

В задних столбах и промежуточной зоне развиваются вставочные (ассоциативные) нейроны, и их аксоны вступают в белое вещество спинного мозга, образуя проводящие пути. В задние рога входят аксоны клеток спинальных ганглиев.

Ганглиозная пластинка развивается из средних отделов нервной трубки, ее основу составляют две группы клеток, расположенных по краям нервных валиков перед их окончательным смыканием в нервную трубку. Клетки ганглиозной пластинки служат исходным материалом для чувствительных краниальных нервных узлов (многочисленные ядра мультиполярных нейронов ствола мозга, предназначенные для переключения нервных импульсов, восходящих к коре и нисходящих от нее на ствол и спинной мозг), а также спинальных нервных узлов вегетативной нервной системы, иннервирующей внутренние органы, сосуды и железы.

Миграция и размещение нейронов

Уникальной особенностью нервной системы является высокая точность формирования общей сети межнейронных связей. Эта особенность обеспечивается генетическим предназначением каждого нейрона, который «знает» то конкретное место, куда растет его

аксон (только к своей клетке-мишени), игнорируя другие клетки и создавая синапсы не в любом, а «заранее определенном» месте и при этом проходя путь, нередко равный 50 см.

В основе столь точного пути лежит химическое сродство, выражающееся в наличии на поверхности клеток-мишеней своеобразных химических меток (хапотаксических ориентиров), позволяющих аксонам их узнавать. Полагают, что в этом процессе важная роль принадлежит топографическим взаимоотношениям нейронов и хро-

нологической последовательности созревания их функциональных связей.

Миграция молодых нейронов в кору головного мозга осуществляется центробежно к краевой (наружной) зоне по глиальным волокнам, располагающимся в толще стенки мозгового желудочка, - это основной путь миграции. Молодые нейроны не имеют аксона и дендритов, но у них на месте будущего аксона есть *конус роста*, находящийся в постоянном «ощупывающем пространстве» движении и определяющий направление миграции. Конус роста аксона имеет аппарат узнавания химических ориентиров, находящихся в стенке мозгового желудочка - это *гликопротеидные (хапотаксические) факторы*.

Мигрируя по стволу радиальной глии, молодые нейроны один за другим отправляются к будущей коре больших полушарий, собираясь в конце пути в нейронные модули или колонки. Чем позже добрался до своей колонки нейрон, тем более поверхностное место на ней он занимает над ранее пришедшими нейронами, пробираясь сквозь их слои вверх.

В соответствии с послойным размещением нейронов в коре больших полушарий в дальнейшем будут различаться функции ее «этажей». Для других отделов нервной трубки, из которых формируются структуры ствола головного и спинного мозга, характерны миграция и размещение нейронов с их концентрацией не в колонках, а пластах, например, располагающихся в краниальных и спинальных ганглиях.

Таким образом, размещение нейронов в строго определенных местах не является случайным - оно генетически детерминировано. В связи с этим возникает возможность создания аксонами нейронов ложных межнейронных связей, и тогда появляются неполноценные нейроны, занимающие не «свои места». Такие нейроны утрачиваются. Механизмы их гибели различны - это либо некроз, либо апоптоз нейрона (см. главу 10).

Рост аксонов и дендритный спраунинг

Рост аксона нейрона начинается с движения конуса роста к клетке-мишени. Скорость этого роста определяется скоростью роста (перемещения) цитоскелета аксона, которая не превышает 2 мм в сутки. Одновременно к встрече с конусом роста готовится клетка-мишень, формирующая на своей поверхности рецепторное поле для образования точечного контакта при этой встрече.

Время роста аксона к клетке-мишени соответствует времени созревания на ее поверхности рецепторного поля, т.е. это генетически контролируемый синхронный процесс. В случае образования точечного контакта одного из щупальцев конуса роста с клеткой-мишенью в этом месте формируется терминальное утолщение, участвующее в образовании полноценного синапса.

Дендритный спраунинг - это арборизация (ветвление) дендритов нейронов и образование дендритного дерева (сети). Первые дендритные отростки появляются в начале перинатального периода вскоре после завершения миграции и размещения нейронов в коре и подкорковых структурах мозга. Затем рост дендритов прерывается на период родов и восстанавливается в раннем постнатальном нейроонтогенезе (после неонатального

периода). В это время расширение дендритной сети идет в основном за счет процесса ветвления, а не увеличения количества дендритов, так как один нейрон имеет 1-3 таких отростка.

Наиболее интенсивный дендритный спраунинг происходит в постнатальном нейроонтогенезе, когда постепенно увеличивается действие факторов окружающей среды на мозг ребенка. Подтверждением этому служит рост массы головного мозга. Если мозг новорожденного весит 350-400 г, то в 9 мес его масса удваивается, в 3-5 лет утраивается, 18-20 лет мозг весит 1500-1600 г., а у взрослого человека его масса даже достигает 2000 г.

Следует отметить, что именно возобновлением строительства дендритного дерева, формированием нервных окончаний и следующим за ними синаптогенезом головной мозг начинает последовательно отражать нарастающее действие на него факторов окружающей среды и таким образом адаптироваться к ним. Иными словами, это отражение перенесено из антенатального в постнатальный нейроонтогенез, т.е. отсрочено во времени.

Миелинизация нервных волокон

Миелинизация нервных волокон - это их обволакивание (одевание) в миелиновые оболочки, состоящие из особых глиальных (шванновских) клеток, содержащих миелин - жироподобный пигмент из липидов и пептидов. Как сказано выше, начало миелинизации нервных волокон и окончаний приходится на антенатальный этап. Миелинизация значительной части нервных волокон и окончаний завершается в первом десятилетии жизни.

Среди причин, нарушающих миелинизацию, следует привести *перивентрикулярную энцефалопатию и лейкомаляцию*, в ходе которой активируются факторы некроза опухолей (ФНО), инициирующие аутоиммунный процесс в белом веществе с дисмиелинизацией и атрофией нервной ткани.

Переход к постнатальному этапу

Мозг плода перед родами значительно увеличивается в объеме, достигая 350-400 г. Это происходит благодаря росту аксонов. Параллельно увеличению массы мозга растет масса тела, достигающая у новорожденного 3,0-3,5 кг. Соответственно растет потребность мозга в кислороде, и плацента постепенно начинает не справляться с ее удовлетворением, что приводит к усилению физиологической гипоксии плода, которая служит сигналом к завершению внутриутробного этапа развития и вызывает роды.

Непосредственно перед родами в материнском организме повышается концентрация биологически активных веществ гормональной, пептидной и липидной природы. Этот «материнский коктейль» проникает через плаценту в организм плода и вызывает в нем состояние готовности к рождению: снижение температуры тела, трофики и обмена веществ, замедление нервной, эндокринной и иммунной активности, уменьшение частоты сердечных сокращений, ослабление дыхания и активных движений. В результате действия «материнского коктейля» снижается потребность плода в кислороде и повышается его устойчивость к гипоксии во время родов.

Постнатальный этап

В сравнении с другими органами и системами организма, мозг новорожденного считается наиболее подготовленным к условиям существования в постнатальной жизни. Однако это относится не столько к непосредственному функционированию мозговых структур, сколько к их дальнейшему развитию и обучению навыкам работы в окружающей среде, т.е. речь идет об адаптации мозга к абсолютно новым для него условиям внешней среды.

Такая адаптация возникает не сразу: сначала ей предшествует первая «стрессовая» неделя, или неонатальный период жизни. Адаптация начинается с периода первичной настройки жизненно важных функций (дыхание, кровообращение, пищеварение).

Период первичной настройки жизненно важных функций

Сразу после рождения на мозг новорожденного обрушивается мощный поток воздействия факторов окружающей среды. В первые секунды и минуты жизни выключаются старые механизмы дыхания и кровообращения через плаценту и включаются новые механизмы дыхания и кровообращения через легкие. Резко изменяются условия гравитации (после нахождения организма в околоплодных водах). Появляются и быстро нарастают потоки афферентной (сенсорной) информации в виде зрительных, слуховых и тактильных раздражителей. При этом в течение 1-2 ч жизни у новорожденного нейтрализуется действие «материнского коктейля» (см. главу 12).

В первые 12 ч жизни (или к концу первых суток) начинают подавляться, а затем постепенно утрачиваются (как правило, в течение первой недели жизни) *базовые врожденные автоматизмы* (кроме автоматизмов сосания и шагового), а также исчезают врожденные способности удерживать голову, имитировать движения матери или врача (например, показывать язык), т.е. развивается «феномен обнуления». Вместе с тем частично сохраняются остаточные функциональные возможности «уходящего» этапа онтогенеза, и на их фоне формируются новые (или обновленные) функции. Например, при сохранении автоматизма сосания развиваются и закрепляются функции захвата материнского соска, активного сосания, жевания и проглатывания. Таким образом, начало постнатального этапа нейроонтогенеза связано с первичной настройкой жизненно важных функций организма и «прощанием» с внутриутробными функциями.

Долговременный адаптационный период

После первичной настройки жизненно важных функций следует долговременный адаптационный период, в ходе которого мозг ребенка медленно приспосабливается к новым условиям окружающей среды и постепенно увеличивается в объеме. Начиная со второй недели жизни возобновляется (после «консервации» на период родов) рост аксонов и дендритов. Их рост служит базой для последующего развития межнейронных сетей (спраунинга), в ходе которого будут совершенствоваться («повышать функциональное мастерство») нервная система и смежные с ней другие системы организма. При этом продолжается миелинизация аксонов и дендритов, идет глиальная дифференцировка, трофическое и иммунное обеспечение нервной ткани.

В первые 2 мес жизни в ходе аксоно-дендритного спраунинга первыми начинают ветвиться отростки пространственно отдаленных нейронов. За ними постепенно объединяются в общую межнейронную сеть нервные окончания ранее разветвившихся раздельно отростков нейронов, в которых в дальнейшем происходит *синаптогенез*.

В течение 3-18 мес жизни происходит интенсивное развитие связей сенсорной системы и двигательных навыков ребенка, необходимых для активных контактов с внешней средой, т.е. начинается процесс «обучения». В это время ребенок последовательно осваивает активное видение и слух, навыки держания головы, ползания, сидения, стояния, хождения, понимание обращенной речи, произношение отдельных слов и т.д. (см. главу 12). Благодаря отсроченному и последовательному спраунингу, масса каждого нейрона возрастает в 3-5 раз, что является причиной увеличения массы мозга. Ощутимый вклад в это увеличение вносит миелинизация нейронов, нервных стволов и волокон, а также пролиферация глиальных клеток. Далее постепенно формируются центральные отделы зрительного, слухового, двигательного, вкусового и тактильного анализаторов, и на их

основе начинаются длительный период обучения и приобретения мозгом ребенка персонального опыта общения с окружающей средой, включающий первые 1,5-3 года жизни, дошкольный и школьный возрастные периоды. Окончательное формирование нервной системы завершается в 18-20 лет.

Апоптоз неполноценных нейронов

Апоптоз неполноценного нейрона - это его запрограммированная гибель или «альтруистическое самоубийство». Как сказано выше, путем апоптоза уничтожаются около 5 млрд (3%) нейронов.

В апоптозе участвуют особые информационные молекулы - ФНО и интерлейкины, относящиеся к классу цитокинов, выполняющих роль переносчиков информации (нейротрансмиттеров). С их помощью регулируются метаболические, трофические, иммунные и другие процессы в нейронах (см. главу 8). ФНО продуцируются в ПВО и гипоталамусе при участии микроглии и астроцитов. Эти цитокины обладают крайне важными для клеток свойствами, выступая как факторы роста, факторы отторжения и как нейроиммуномодуляторы. Во многих случаях их влияние становится пусковым механизмом развития патологии ПВО мозга.

В частности, их высокое содержание вызывает тяжелые нарушения трофики нервной ткани (вплоть до необратимого повреждения, проявляющегося некрозом, некротическим шоком и кахексией), приводит к угнетению (и реже к усилению) пролиферации нейронов, но при этом не влияет на деление трансформированных клеток.

Нередко посредниками действия ФНО могут быть интерфероны. Кроме того, в конце внутриутробного периода ФНО стимулируют синтез простагландинов и могут вызвать преждевременные роды.

Цепочка молекулярных событий, происходящих при апоптозе, до конца не ясна, но, по-видимому, в их основе лежит механизм получения нейроном информации о несоответствии генетической программе.

Молекулярные механизмы формирования межнейронных связей

Известно, что генная сеть, участвующая в формировании и функционировании нервной системы человека, включает около 20 тыс. генов.

В нейронах одновременно экспрессируется не менее 2500 генов (среди них охарактеризовано всего 125 генов или около 5%). Причем эта часть генов резко превышает часть генов, работающих в клетках других органов. Например, из всех молекул мРНК, выделенных из клеток печени или почек, только 4-6% клеток вступают в ДНК-РНКгибридизацию, что крайне мало, так как их должно быть не менее

30%.

Кроме того, высказано предположение, что в нейронах филогенетически молодых отделов головного мозга (у человека они обеспечивают функции, отсутствующие у других биологических видов) экспрессируется больше генов, чем в старых отделах мозга. Например, в пользу этого свидетельствуют данные, что в нейронах ассоциированных зон коры больших полушарий экспрессировались 35,6% генов, а в нейронах проекционных зон - 30,8%.

Эти различия, по-видимому, лежат в основе специализации разных отделов мозга при развитии разных функций. Иными словами, благодаря такой специализации в ходе нейроонтогенеза растет объем активной генетической информации.

В свою очередь, об этом свидетельствуют данные о ДНК-РНКгибридизации, согласно которым по мере увеличения интенсивно-

сти функционирования ПВО усиливаются активность и сложность генетических эффектов в нервной ткани: у 22-недельного эмбриона в нейронах мозга активны только 8% генов, тогда как у взрослых людей их более 25%.

Реализация экспрессии генов в различных областях мозга обуславливает развитие широкой сети межнейронных связей (см. ниже). Основными механизмами развития таких связей являются генерация и проведение нервного импульса и внутриклеточный транспорт структурных элементов цитоплазмы.

Генерация и проведение нервного импульса

Механизм генерации (возбуждения) и проведения нервного импульса в системе межнейронных связей заключается в появлении и быстром распространении (перемещении) реакции локальной деполяризации мембраны осевого цилиндра по длине нервного волокна.

В ходе деполяризации участка мембраны (условно назовем его первым участком) ионы Na^+ меняют отрицательный заряд на положительный путем повышения проводимости этих ионов в смежном участке мембраны (второй участок), что обеспечивает выход ионов K^+ на поверхность мембраны первого участка, в котором восстанавливается исходный уровень разности потенциалов, и так далее по всей мембране осевого цилиндра нервного волокна.

Нервный импульс - это быстрая реакция. Скорость деполяризации мембраны осевого цилиндра определяет скорость передачи нервного импульса, и она тем выше, чем толще осевой цилиндр. В среднем для толстых волокон она составляет 5-120 м/с, а для тонких - 1-2 м/с. При передаче нервного импульса через миелиновые волокна скорость выше, чем при передаче через безмиелиновые волокна.

Локальная деполяризация мембраны также происходит при мышечном сокращении. В этом случае прохождение нервного импульса открывает каналы, обычно закрытые для пассивного транспорта ионов Ca^{2+} , и впускает эти ионы в миофибриллы. В результате в нервно-мышечном синапсе освобождается ацетилхолин, что вызывает локальную деполяризацию мембраны. Выход ионов Ca^{2+} из сократившихся миофибрилл происходит путем их обмена на ионы Na^+ и зависит от натриевого градиента, поскольку существует другая система, обеспечивающая транспорт ионов натрия внутрь, а ионов кальция наружу мембраны (см. главу 6).

Молекулярная организация работы синаптического аппарата сложна. Нейроны, способные выделять в синаптическую щель один и тот же медиатор, объединяются в эргические системы, которые связаны между собой особыми путями - трактами, соединяющими специфические синапсы. С молекулярных позиций хорошо изучена схема работы норадреналинергического синапса (см. главу 8). В этом случае пусковым фактором служит импульс, пришедший из пресинаптической мембраны аксона в постсинаптическую мембрану клетки-мишени, в которой в ответ на импульс возбуждается сигнал, распространяющийся по аксону в пресинаптическую мембрану и в виде пузырьков с медиатором поступающий в синаптическую щель, а потом в постсинаптическую мембрану другой клетке-мишени, - это прерывистый межклеточный аксоно-аксональный контакт. Прерывистость контактов необходима для поддержания быстрой скорости распространения импульса, так как возбуждение может распространяться по мембране нейрона от тела клетки и обратно.

Аксональный транспорт

Наряду с проведением нервного импульса через систему прерывистых межнейронных связей (синапсов) существует второй механизм прохождения молекулярной информации - внутриклеточный транспорт. Для нейрона, основная цитоплазма которого сконцентрирована в аксонах и дендритах, простирающихся на значительные расстояния от ядра клетки, внутриклеточный транспорт или движение элементов цитоплазмы имеет большое значение.

Аксональный транспорт в целом хорошо изучен. Среди транспортируемых элементов:

- лизосомы и пероксисомы - большие, средние и мелкие вакуоли с гидролитическими и окислительными ферментами, представляющие собой емкости для переработки отходов, или своеобразные «очистные сооружения»;
- митохондрии, производящие энергию в виде АТФ, - своеобразные «электростанции»;
- микротрубочки, представленные нестабильным белком определенной полярности - тубулином, выполняющим роль транспортных путей;
- синаптические пузырьки с различными медиаторами и регуляторными ферментами;
- «строительные материалы» - белковые, липидные и другие молекулы;
- продукты распада молекул и др.

В отличие от нервного импульса, аксональный транспорт - это медленные реакции. Их средняя скорость не превышает 2 мм в сутки. Вместе с тем, у разных органелл и элементов цитоплазмы скорости транспорта разные. Так, синаптические пузырьки могут перемещаться со скоростью свыше 400 мм в сутки.

С одинаковой скоростью антеградно (к терминальной части) перемещаются «строительные материалы», а ретроградно (к ядру) - продукты их распада. При этом поддерживается баланс их перемещения: поступает ровно столько, сколько расходуется.

Митохондрии совершают маятниковые движения, двигаясь то антеградно, то ретроградно. Благодаря такому движению обеспечивается энергетическое снабжение по всей длине аксона (дендрита) нейрона.

В аксональном транспорте также принимают участие активированные нервными импульсами сократительные единицы - белки (актин, миозин, тубулин, некоторые ферменты), микротрубочки и другие элементы.

Закономерности информационного обеспечения и основное свойство коры больших полушарий мозга

Информационное обеспечение коры больших полушарий мозга базируется на следующих закономерностях:

- многоуровневое (многоэтажное) прохождение информации; основано на особенностях миграции и размещения нервных клеток при формировании нейронных модулей (колонок), являющихся структурными единицами коры больших полушарий;
- прерывистость прохождения информации в синапсах между этажами, характерная для всей сети межнейронных связей;

- постоянство активности коры мозга; обеспечивается ретикулярной субстанцией, контролирующей прохождение информации между этажами и ее прерывистость в синапсах; при избытке информации эта субстанция ее аккумулирует, создавая резервы, а при недостатке - добавляет из резервов, поддерживая равномерную интенсивность потоков и, следовательно, постоянную активность коры;
- дублирование информационных каналов; основанное на межнейронных связях, формирующих единую сеть рецепторных оконча-

ний, расположенных во всех частях организма; рецепторы этой сети воспринимают разную по содержанию и назначению информацию, в том числе одной направленности; например, положение тела в пространстве контролируется с помощью потоков информации, поступающей в кору головного мозга одновременно от зрительного, вестибулярного и слухового анализаторов, а также рецепторов мышц, кровеносных сосудов, рук, ног, туловища и головы; поэтому в случае ошибок приема и переключения информации кора мозга все-таки получает необходимую информацию и дает правильный ответ. Указанные закономерности позволяют коре больших полушарий анализировать восходящие к ней потоки информации, переключать их в синапсах, изменять скорости проведения, фильтровать (отсеивать) наименее значимую, пропускать и доставлять по месту назначения наиболее значимую информацию, увеличивать или уменьшать ее объемы, поддерживать равномерную интенсивность потоков, адаптироваться к окружающей среде, принимать своевременные и адекватные решения, реализуемые в разнообразных функциях, и, следовательно, поддерживать постоянную активность коры.

Вместе с тем, эти закономерности обеспечивают развитие основного свойства коры больших полушарий - способность отражать (запечатлеть) результаты действия факторов окружающей среды.

В случае нормального нейроонтогенеза это свойство проявляется на морфологическом уровне как специфическая картина зрелой межнейронной сети с особенностями цитоархитектоники и миелоархитектоники (при УЗИ, КТ- и ЯМР-томографии). На физиологическом уровне это свойство выражается как проявление обычного сознания и реализация основных нервных и высших психических функций.

Признаками отражения и адаптации коры к окружающей среде являются:

- готовность к функциональным переменам и последовательной смене старых функций на новые функции и навыки в критические периоды развития;
- полноценное развитие функций и навыков при минимальных энергетических затратах (см. предыдущую главу);
- восполнение утрачиваемых элементов нервной ткани и выбор наиболее эффективных межнейронных сетей при их интенсивной работе;
- пластичность (компенсаторность) функционирования структур мозга в изменяющихся условиях среды при одновременном сохранении их автономности. Важно подчеркнуть особое значение этих признаков при проведении терапии заболеваний, проявляющихся патологией ПВО мозга.

Нарушения нейроонтогенеза как результат первичного поражения перивентрикулярной области мозга

Нарушения нейроонтогенеза относятся к одной из нерешенных проблем нейрогенетики. Их систематизация представляет значительные трудности, объясняемые участием нервной

системы практически во всех патологических процессах. Это относится как к наследственной, так и к ненаследственной патологии.

Нервная система поражается не только первично, но и вторично, на фоне поражения других систем организма, либо одновременно с ними в результате общих механизмов.

На ранних этапах нейроонтогенеза мозг эмбриона почти исключительно представлен ПВО, к сфере деятельности которой относятся: миграция и размещение нейронов, образование нейронных колонок, рост аксонов и дендритов, формирование синапсов. ПВО регулирует эти процессы на основе химического узнавания своих нейронов среди множества чужих, что сближает ее с иммунной системой.

Находясь на границах капиллярного кровотока и цереброспинальной жидкости, ПВО выполняет защитные (барьерные) функции, что также сближает ее с иммунной системой. В качестве барьеров выступают астроцитарные клетки, играющие роль рецепторов, воспринимающих молекулярную информацию из капиллярного кровотока и при циркуляции ликвора.

Таким образом, ПВО является особой системой мозга. Она обеспечивает медленные процессы его развития, выполняя формообразующую (ростовую) функцию, сохраняя трофический и иммунный гомеостаз нервной ткани и выступая в роли «стража» (гематоэнцефалический и ликвороэнцефалический барьеры) на границах между капиллярным кровотоком или ликвором с одной стороны и мозгом, с другой стороны.

При патологии ПВО все эти медленные процессы тормозятся и останавливаются, приводя к неврологической патологии. На рис. 51 показана роль ПВО мозга в развитии такой патологии.



Рис. 51. Роль

ПВО мозга в нарушении матричной, формообразующей, трофической и иммунной функций (по Скворцову И.А., 2000)

ПВО поражается при морфогенетических нарушениях и нарушениях метаболизма мозговых структур, нейроинфекции, гипоксии мозга и родовой травме. Поражение ПВО, возникшее в результате этих причин, ведет к нарушениям формообразования структур мозга, гипоплазии и другим его аномалиям, нарушениям трофического и иммунного обеспечения критических периодов нейроонтогенеза и как следствие - к функциональному дефициту мозга. На рис. 52 представлена схема взаимосвязи основных причин и результатов поражения ПВО мозга.

Функционирование ПВО зависит от гестационной незрелости (влияние эндотоксинов, ФНО и других цитокинов), а также от перинатального неблагополучия (гипоксия и родовая травма). Наряду с этими причинами в перечне причин такой зависимости

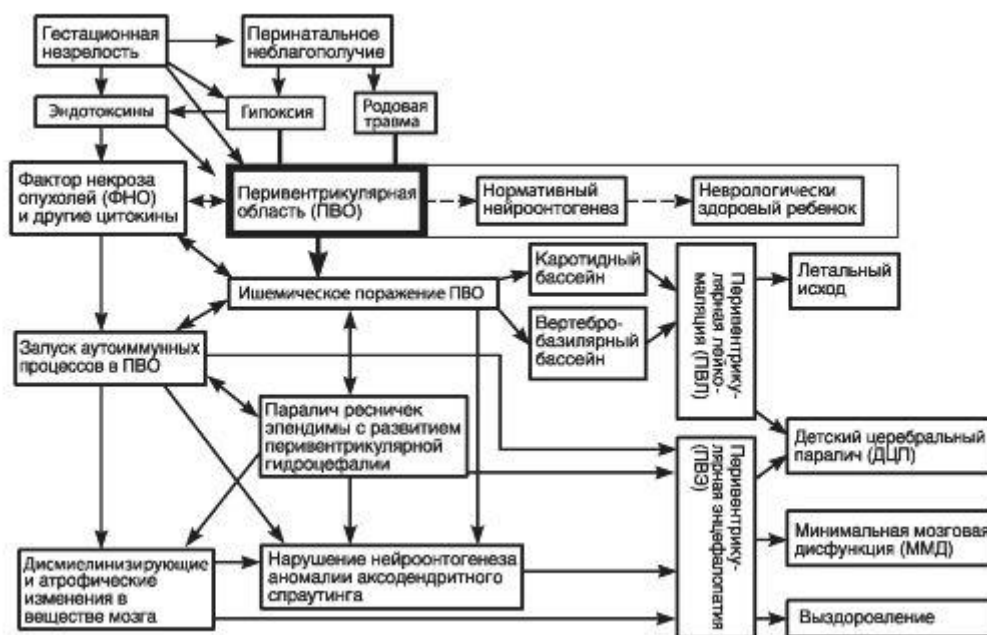


Рис. 52.

Примерная схема взаимосвязи основных причин и результатов поражения ПВО мозга (по Скворцову И.А., 2001)

значатся недоношенная беременность, фетоплацентарная недостаточность в результате инфицирования матери во время беременности, инфаркты плаценты, внутриутробное инфицирование плода, повышенное давление ликвора в желудочках мозга, малый вес и артериальная гипертензия на фоне дыхательных расстройств у новорожденного, НБО, хромосомные синдромы, первичные нейрогенетические заболевания нейрона и глиальных элементов, болезни рецепторов, трансмембранного транспорта разных ионов и нейромедиаторов.

Все перечисленные причины нарушают формообразование, трофику и иммунную защиту мозга и даже при слабо выраженных изменениях ведут к гипоплазии и/или незначительному функциональному дефициту, а при изменениях средней и тяжелой степени - к перивентрикулярной энцефалопатии (ПВЭ) и лейкомалии соответственно.

В ряде случаев изменения ПВО имеют общие механизмы. Например, внутриутробная нейроинфекция и/или гипоксия плода могут вызвать паралич ресничек эпандимы, выстилающей стенки желудочков мозга и спинномозгового канала, что обусловит развитие врожденной (вентрикулярной) гидроцефалии, повышение внутричерепного давления, нарушение циркуляции ликвора и таким образом приведет к задержке аксонального и дендритного спраунинга, синаптогенеза, дистрофическим или деструктивным изменениям в коре и подкорковых образованиях.

Среди тяжелых перинатальных поражений ПВО следует отметить действие эндотоксинов кишечника, стимулирующих у плода и новорожденного продукцию ФНО, интерлейкинов и других цитокинов, приводящих к расстройствам микроциркуляции, апоптозу и аутоиммунным нарушениям в тканях мозга. При этом аутоиммунные механизмы реализуются путем возникновения ишемических и геморрагических очагов в бассейнах каротидной и вертебробазилярной сосудистых систем ПВО, коре больших полушарий, подкорковых и стволково-мозжечковых структурах с последующими дистрофическими или деструктивными изменениями в них в виде дисмиелинизации и атрофии, что может привести к смерти. Однако значительно чаще в ПВО развиваются не грубые деструктивные процессы (лейкомаляция), а дистрофия, в основе которой лежат долговременные метаболические, трофические и иммунные нарушения (энцефалопатия).

Вместе с тем, если основные формообразующие процессы в мозге уже завершились, то эти изменения ограничиваются незначительными нарушениями трофики и иммунного обеспечения нервной ткани.

СОЧЕТАННЫЕ ПОРАЖЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СТРУКТУР МОЗГА

В ходе эволюции в структурах мозга наряду с медленной функциональной системой были сформированы и объединены быстрые системы. В этом случае речь идет о таких областях мозга, нейроны которых образуют лимбическую и стриопаллидарную системы, ретикулярную субстанцию и диэнцефальную область.

Эти функциональные образования (так же, как ПВО) отвечают за реализацию жизненно важных функций и обеспечивают постоянную активность коры больших полушарий. Поэтому их поражение обуславливает нарушения развития психических и нервных функций.

В связи с этим у больных с поражением ПВО часто наблюдается сочетание нарушений развития психоневрологических функций с разными формами ДЦП, ранним детским аутизмом, изолированными дисфазиями и другими нарушениями речевого развития, умственной отсталостью (УО) и олигофренией, врожденной перинатальной слепотой и тугоухостью.

Сочетающиеся с другой патологией поражения ПВО наблюдаются при:

- врожденных болезнях нервной системы (анэнцефалия, проэнцефалия с дефицитом мозгового вещества и межнейронных сетей, дефекты нервной трубки, тканевые и органые дисплазии);
- хромосомных синдромах, обусловленных структурными мутациями;
- факоматозах (туберозный склероз, атаксия-телеангиэктазия и др.);
- синдромах Ангельмана, Мартина-Белла, Прадера-Вилли, Ретта и Фара;
- ФКУ, сочетающейся с УО;
- аутистических синдромах, сочетающихся с УО;
- болезнях, связанных с нетрадиционным наследованием генов и признаков (болезни накопления, митохондриальные и перокси-сомные болезни, болезни импринтинга, экспансии числа нуклео-

тидных повторов). Основными причинами нарушений нейроонтогенеза являются геномные мутации, обуславливающие наследственные дефекты метаболизма в нервной системе и экстракневральных системах, а также хромосомные нарушения и пороки развития. Наряду с ними существенную роль играют факторы среды, включающие гипоксические, травматические, сосудистые и инфекционные поражения мозга во внутриутробном, перинатальном и постнатальном периодах развития.

Все эти причины ведут к болезням нейрона, нарушениям развития психоневрологических функций, болезням и аномалиям развития, связанным с недостижением мозгом «критической массы». В их основе лежит нарушение аксоно-дендритного спраунинга и формирования единой сети межнейронных связей, большая часть которой (до 80%) приходится на головной и спинной мозг.

Синдром нарушений развития психоневрологических функций

Данный синдром отражает отклонения в развитии мозговых структур от генетической программы нейроонтогенеза. Эти нарушения включают 5 групп изменений психоневрологических функций: двигательных (например, ДЦП), перцептивных (тугоухость и снижение зрения), интеллектуальных (УО и олигофрения), речевых (дизартрия и дисфазия) и коммуникативных (замкнутость, привязчивость, эмоциональная расторможенность, аутистические проявления).

Указанные изменения могут быть транзиторными и проявляться как временная задержка и десинхронизация темпов развития, но могут трансформироваться в постоянные изменения. При этом важную роль играют критические периоды нейроонтогенеза, в которые реализуются генетические и негенетические причины.

Классификация и примеры первичных нейрогенетических болезней

Первичные нейрогенетические заболевания (ПНГЗ) делятся на две группы.

Первая группа ПНГЗ - болезни нейрона и элементов его цитоплазмы, дефекты которых нарушают механизмы возбуждения и проведе-

ния нервного импульса в мембранах нейронов и внутриклеточного транспорта в аксонах и дендритах.

Вторая группа ПНГЗ - болезни клеток нейроглии, нарушающие гематоэнцефалический и ликвороэнцефалический барьеры, а также опорную, трофическую, иммунную и секреторную функции.

К ПНГЗ относятся болезни:

- метаболизма и катаболизма белков, липидов и углеводов, формирующих клетки-предшественники, сами нейроны и клетки глии;
- структуры и функционирования лизосом, митохондрий и пероксисом, обеспечивающих хранение и переработку «отходов» и энергоснабжение клетки;
- структуры и функционирования ЭР и аппарата Гольджи, контролирующих формообразующие, регенеративные, трофические, секреторные и другие процессы, связанные с синтезом, сортировкой и рассылкой разных молекул по назначению («молекулярная почта»).

Следует отметить, что это всего лишь рабочая классификация ПНГЗ, не претендующая на полноту охвата всего их спектра, т.е. она достаточно условна.

Вместе с тем, эта классификация учитывает возможность неограниченного ее дополнения новыми группами заболеваний, например болезнями синаптогенеза, болезнями, связанными с нарушениями переработки внутриклеточных отходов и последующим производством из них «строительных материалов», болезнями рецепции информации, болезнями кринирования нейромедиаторов и т.д.

Кроме того, в последние годы многочисленными примерами ПНГЗ стали:

- болезнь Альцгеймера, старческое слабоумие (4 генокопии: 1q31-q42; 17q11.2; 19q13.2 и 21q21.3-q22.05 и вариант прионной болезни) - см. главу 29;
- псевдогипертрофические мышечные дистрофии Дюшенна и Беккера (Xp21.2, ген DMD);
- болезни «центрального стержня»: отсутствие митохондрий и саркоплазматической сети в сердцевине мышечных волокон, немалиновая дистрофия (дефекты нитеобразного и палочковидного стержней или Z-линий);
- центронуклеарная или миотубулярная миопатия (отсутствие миофибрилл и центрального расположения ядер);
- аксональная полиневропатия (аномалии белков и структур цито-

скелета, нарушения антеградного и ретроградного транспорта, мембранного транспорта и дефекты митохондрий);

- болезни трех рецепторов соединительной ткани, включая дефекты фактора роста фибробластов - синдромы Апера и Бира-Стивенсона (10q25.3-q26), синдром Пфайффера (8p12), ахондроплазию, томатоформную дисплазию и изолированный краниостеноз (4p16.3);

- болезни рецепторов андрогенов (Xq11-q12), включая синдром тестикулярной феминизации Морриса, синдром Ренфейнштейна с мужским псевдогермафродитизмом, болезнь Кеннеди с нейропатией и нарушениями половой дифференцировки (см. главы 16 и 23);

- болезни глюкокортикоидных рецепторов (5q31), включая гомозиготный вариант болезни Аддисона с отсутствием реакции на АКТГ (18p11.2);

- болезни ацетилхолиновых рецепторов мышц, объединенных общим названием - «миастения».

Безусловно, к ПНГЗ следует отнести ряд заболеваний материнского наследования: гликогенозы, мукополисахаридозы, муколипидозы, а также болезни, связанные с нарушениями трансмембранного транспорта разных ионов, включая гипокалиемический (1q31-q32) и гиперкалиемический (17q23.1-q25.3) периодический паралич, парамитонию Эйленбурга (тот же локус 17q23.1-q25.3), врожденную миотонию Томсена (7q35) и др.

К болезням нейроглии относится синдром Картагенера (14q32; ген DNECL) или болезнь неподвижных ресничек, для которой характерно обратное расположение внутренних органов.

Другими примерами заболеваний этого класса являются разные типы моторно-сенсорных нейропатий и, в частности, нейропатия IX типа, в основе которой лежат множественные мутации гена GJB1, контролирующего синтез белка - коннектина 32 (Cx32), участвующего в образовании щелевых соединений и ионных каналов в леммоцитах

(шванновских клетках) миелиновых оболочек. Всего было идентифицировано свыше 230 мутаций гена GJB1, приводящих к нарушению проведения нервного импульса по периферическим волокнам.

Как причины тяжелого поражения ПВО мозга были выделены транзиторные ишемии с дистрофическими изменениями нейронов, а также макро- и микроглии.

Оказалось, транзиторные ишемии глиальных элементов могут компенсироваться и не вызывать отрицательных последствий, но могут и привести к запуску пролиферации клеток, усилению активности макрофагов и других реакций гуморального иммунитета, приводящих к тяжелым изменениям вплоть до расширения желудочков мозга, атрофии коры больших полушарий, червя и коры мозжечка, а также ствола головного мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие и функционирование нервной системы, реализация высших психических и основных нервных функций человека базируются на особенностях строения и функционирования его генома.

В настоящее время из-за отсутствия совершенных геномных и протеомных технологий невозможен глубокий молекулярный анализ нарушений ПВО мозга, а также нарушений развития психоневрологических функций. Вместе с тем, имеются определенные достижения в изучении способности нейрона генерировать нервный импульс и передавать его по системе межнейронных связей на ткани рабочих органов и высшие структуры мозга.

Биохимическими посредниками при передаче нервного импульса служат нейромедиаторы (их известно около 30), которые могут возбуждать (стимулировать) или угнетать (тормозить) его проведение.

Большим достижением молекулярной медицины явилось открытие химической специализации нейронов. Разные нейроны обрабатывают разную, но всегда соответствующую только их функциональному назначению молекулярную информацию, оценивают ее и адекватно на нее реагируют, потребляя ресурсы специфических химических веществ (медиаторов), содержащихся в клетке и организме.

Очевидно, что для эффективного функционирования нейронов необходим синтез конкретных (только для них) химических веществ, что, безусловно, контролируется генотипом. Если учесть, что число всех синапсов у человека составляет 10^{14} , а генов в генотипе только 40 тыс., то химическая (медиаторная) специализация нейронов, по-видимому, каждый раз кодируется каким-то одним или несколькими генами, тогда как целенаправленный рост аксона нейрона к своей клетке-мишени обусловлен общими регуляторными механизмами.

Закодированная в генах морфологическая, функциональная и химическая специализация нейронов проявляется при образовании

специфических рецепторов на поверхности мембран, обладающих избирательной чувствительностью к конкретным медиаторам.

Медиаторная специализация нейронов проявляется в строении их секреторного аппарата, обеспечивающего синтез белков-ферментов, соответствующих поступающей к ним информации. Соотношение медиаторов в разных нейронах в разные периоды нейронтогенеза определяет точные сроки экспрессии нейрональных генов.

Выделена особенность нейроонтогенеза: избыточность (резерв) нейронов. В ходе нейроонтогенеза нейроны, оказавшиеся незадействованными либо функционально неполноценными, постепенно утрачиваются путем апоптоза (резерв остается), а их отростки и контакты элиминируются и (благодаря этому) постоянно уточняется генетическая программа нейроонтогенеза. Иными словами, гибель нейронов как бы исключает дальнейший постнатальный рост их числа.

Избыточность и элиминация нейронов - это два сопряженных механизма функционирования коры мозга. Интенсивный и избыточный синаптогенез происходит в течение первых 10-15 лет жизни. Параллельно (по мере «выбраковки» неполноценных нейронов) уменьшается общее количество контактов между ними, достигая количества, типичного для взрослого организма. При этом сохраняются именно те контакты, которые были непосредственно вовлечены в проведение молекулярной информации, т.е. это прямой результат отражения корой мозга «накопленного ею» опыта взаимодействия с окружающей средой или результат ее обучения (адаптации) такому взаимодействию.

Избыточность межнейронных контактов особенно заметна у детей, наиболее приспособленных к обучению. Именно поэтому следует учитывать компенсаторные возможности головного мозга детей при назначении им корректирующей терапии различных психоневрологических нарушений. Если при некоторых первичных генетических неврологических заболеваниях, например при врожденном гипотиреозе или ФКУ, своевременно (до 3-6 мес жизни ребенка) заблокировать образование вредных метаболитов, то грубого повреждения мозга не будет, и у ребенка не проявится задержка психомоторного и физического развития, а впоследствии не разовьется интеллектуальный дефицит. Также эффективно можно избежать повышения уровня ганглиозидов, предшествующих развитию интеллектуальнопознавательной недостаточности, а при снижении их уровня - развитию ДЦП.

ГЛАВА 14 ОНТОГЕНЕЗ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО НАРУШЕНИЯ ОБЩИЕ ДАННЫЕ

Клетки многоклеточного организма в ходе обмена веществ выделяют продукты метаболизма в окружающую их тканевую жидкость (кровь, лимфу, ликвор). Часть этих продуктов обладает биологической активностью, т.е. способностью регулировать (усиливать или ослаблять) различные молекулярные реакции. Эти вещества называются гуморальными факторами или гормонами, а органы (железы) и клетки, вырабатывающие (кринирующие) эти факторы, называются секреторными. Среди них имеются органы эндокринной (внутренней) и экзокринной (внешней) секреции, которые выделяют гормоны соответственно внутрь или наружу организма.

К эндокринной системе относятся: гипоталамус, гипофиз, щитовидная железа, паращитовидные железы, вилочковая железа, эпифиз, мозговая и корковая части надпочечников, гонады и другие железы. К экзокринной системе относятся потовые, слюнные, слезные, подязычные, подчелюстные и другие железы. К органам со смешанной секрецией относятся поджелудочная железа и гонады (семенники и яичники).

Большинство эндокринных органов продуцируют одновременно несколько гормонов.

Единство эндокринной, экзокринной и нервной систем

Функционирование всех внутренних органов и эндокринных желез, а также кровеносных и лимфатических сосудов, контролируется вегетативной нервной системой, которая их

иннервирует и с помощью специфических посредников (нейромедиаторов) регулирует происходящие в них энергетические, трофические и метаболические процессы. Координирующая роль в этой регуляции принадлежит гипоталамусу - специфическому образованию, локализованному в промежуточном мозге (диэнцефальная область) и объединяющему ряд самостоятельных морфофункциональных компонентов головного мозга. В свою очередь, этот орган входит в состав высшего вегетативного центра мозга - лимбической макросистемы (см. главу 13).

Под контролем гипоталамуса находится гипофиз, который нередко называют мозговым придатком или промежуточным звеном (посредником) между нервной и эндокринной системами, что позволяет считать его центральным эндокринным органом, вырабатывающим множество гормонов, стимулирующих развитие и рост организма через слаженную работу всех эндокринных и экзокринных желез, внутренних органов и сосудов. Тропные гормоны гипофиза избирательно активируют щитовидную железу, глюкокортикоидную функцию коры надпочечников и гонады. Вместе с тем, нервная система может самостоятельно воздействовать на нижестоящие эндокринные и экзокринные органы, минуя гипофиз - по афферентным путям нейронов.

Помимо тропных гормонов гипофиза, во все периферические железы поступают другие его гормоны (см. ниже), под действием которых регулируется функционирование периферических эндокринных органов, и их гормоны также разносятся с током крови по всему организму. При этом одна их часть поступает в гипоталамус, где инициирует выработку новых рилизинг-факторов, тем самым замыкая старый и одновременно начиная новый круг регуляторных молекулярных событий. Другая часть гормонов поступает (параллельно с передачей нервных импульсов через межнейронные сети и синапсы) во все внутренние органы и ткани, где регулирует их функционирование.

Таким образом, система нейроэндокринной регуляции путем активного функционирования внутренних органов, эндокринных и экзокринных желез и сосудов базируется на принципе прямой и обратной связи и общем (для всех участников происходящих молекулярных реакций) механизме связи между центральными и периферическими отделами вегетативной нервной системы.

Основные эндокринные железы, их гормоны, ткани-мишени и функции

В табл. 8 приведены основные эндокринные железы, их гормоны, ткани-мишени и функции.

Таблица 8. Эндокринные железы, их гормоны, ткани-мишени и функции (по В. Эллиот, Д. Эллиот, 2002)

Название железы	Синтезируемый гормон	Ткань (орган)-мишень	Функции
Гипоталамус	Рилизинг-факторы: либерины, статины (соматостатин), тиреотропный рилизинггормон (ТРГ)	Передняя доля гипофиза	Стимуляция синтеза гормонов: усиление - либерины, торможение -

			статины	
Передняя гипофиза	доля	Тиреотропный гормон (ТТГ)	Щитовидная железа (ЩЖ)	Стимуляция синтеза Т ₄ и Т ₃
		Адренокортикотропный гормон (АКТГ)	Кора надпочечников	Стимуляция адренокорти- костероидов
		Гонадотропины: лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)	Яичники, яички, грудные железы	Стимуляция половых гормонов, лактации и развития клеток
		Соматотропин (СТГ)	Печень, многие ткани	Рост и развитие организма, стимуляция инсулиноподобных факторов роста (IGFI и IGFI)
Задняя гипофиза	доля	Антидиуретический гормон (АДГ), вазопрессин, окситоцин	Почечные каналы, гладкая мускулатура	Стимуляция реабсорбции, сокращений матки, гладкой мускулатуры
Промежуточная часть гипофиза		Интермедин или меланоцитостимулирующий гормон (МЦСГ)	Меланофоры (пигментные клетки), кора надпочечников	Контроль окраски кожи, адаптации сетчатки глаз к сумеркам, активация коры надпочечников

Продолжение табл. 8

Эпифиз	Серотонин, Меланотонин или антагонист МЦСГ (см. гипофиз)	Эпиталамическая область III мозгового желудочка, гипофиз	Торможение гонадотропной функции, преждевременное половое созревание при полном блоке синтеза ЛГ
Тимус (вилочковая железа)	Тимозин	Эпителий тимуса, кора надпочечников	Стимуляция синтеза антител, угнетение секреции гормонов коры надпочечников
Щитовидная железа (ЩЖ)	Гликопротеидный коллоид (йод+РНК) или тиреоглобулин: монойодтирозин, дийодтирозин, трийодтиронин (Т ₃) и тироксин (Т ₄)	Печень, мышцы, многие другие ткани	Стимуляция различных типов метаболизма
	Тиреокальцитонин	Кровь, костная	Снижение уровня ионов Ca ²⁺ в

	антагонист паратиреоидного гормона ПЩЖ	ткань	крови, угнетение синтеза паратиреоидного гормона (см. ПЩЖ)
Паращитовидные железы (ПЩЖ)	Паратиреоидный гормон	Кровь, костная ткань, почки, кишечник	Повышение уровня ионов Ca^{2+} в крови (угнетение тиреокальцитонина - см. ЩЖ), стимуляция реабсорбции Ca^{2+}
	Кальцитонин (также см. ЩЖ)	Кровь, костная ткань, почки,	Торможение реабсорбции Ca^{2+}

Продолжение табл. 8

Кора надпочечников	Глюкокортикоиды: гидрокортизон, кортизол, кортикостерон	Многие ткани, сосуды	Стимуляция фосфорилирования, углеводного обмена, сопротивляемости организма, распад лимфоцитов, уменьшение проницаемости капилляров, подавление фагоцитоза, синтеза коллагена и воспаления
Кора надпочечников	Минералокортикоиды (альдостерон)	Кровь, соединительная ткань, другие ткани	Регуляция водно-солевого обмена (уровня Na в крови), усиление синтеза коллагена и воспаления
Кора надпочечников	Андрогены: антимюллеров гормон (АМН) или MIS-фактор, тестостерон	Экстрагенитальные ткани, репродуктивные органы, вторичные половые органы	Регрессия мюллеровых протоков, развитие яичек, рост размеров тела, созревание сперматозоидов, маскулинизация экстрагенитальных тканей, ингибирование роста опухолевых клеток, формирование мужских половых органов

Окончание табл. 8

Кора надпочечников	Эстроген (эстриол), прогестерон	Экстрагенитальные ткани, репродуктивные органы, вторичные половые органы	Стимуляция половой зрелости организма, функционирование половых органов
Мозговое вещество	Катехоламины: адреналин,	Печень, мышцы,	Мобилизация в кровотока

надпочечников	норадреналин	сердце	жирных кислот и глюкозы
Гонады	Андроген яичек (тестостерон), эстрогены яичников (прогестерон и фолликулин)	Репродуктивные органы, вторичные половые органы	Стимуляция половой зрелости организма, функционирование половых органов
Печень	Соматомедины или инсулиноподобные факторы роста (IGFI и IGFIИ) - см. гипофиз	Печень, костная ткань	Стимуляция роста
Поджелудочная железа (ПЖ)	Панкреатический сок Инсулин, глюкагон, липокаическая субстанция	Желудок, тонкий кишечник Печень, мышцы, многие ткани	Расщепление жиров, белков и углеводов Регуляция углеводного и жирового обмена

ХАРАКТЕРИСТИКА ОНТОГЕНЕЗА ЭНДОКРИННЫХ ОРГАНОВ И ИХ ГОРМОНОВ

Онтогенез большинства эндокринных и экзокринных желез начинается с секреторных клеток - производных эпителия, которые приобретают способность выделять (кринировать) гормоны. Вместе с тем, секреторной способностью обладают клетки другого происхождения: нейросекреторные клетки гипоталамуса, клетки глиии (эпендима субкомиссурального отдела мозга и эпифиза), клетки мозговой части надпочечников и параганглиев, клетки мезенхимы гонад (интерстициальные клетки) и плаценты.

Гипоталамус

Гипоталамусу принадлежит роль главного регуляторного центра лимбической системы головного мозга и координационного центра системы периферических эндокринных и экзокринных желез. Гипоталамус производит рилизинг-факторы, к которым относятся: либерины, статины (соматостатин), ТТРГ. Этот орган объединяет ряд собственных структур и структуры других образований мозга.

К собственным структурам - ядрам - относятся: супраоптическое и супрахиазматическое (находятся под хиазмой зрительных нервов), переднее, паравентрикулярное, преаркуатное, вентромедиальное и дорсомедиальное ядра. К другим структурам гипоталамуса относятся: комплекс мамиллярных ядер, аденогипофизотропная зона (см. ниже аденогипофиз) и преоптическая область мозга.

Аксоны нейронов гипоталамуса идут от ядер его передней доли к ножке гипофиза и через нее проходят к задней доле гипофиза, где заканчиваются нервными окончаниями в гемокapиллярных синапсах, отсутствующих в передней доле гипофиза (нервные окончания в нее не входят).

Клетки супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса не участвуют в продукции аденогипофизотропных факторов. Их производство обеспечивает базальная часть гипоталамуса в составе аркуатного, вентромедиального, инфундибулярного ядер серого бугра. Поражение гипоталамуса обуславливает нарушения функционирования гипофиза.

Гипофиз

У зародыша на 4 нед развития из эпителия крыши ротовой полости выступает гипофизарный карман, который растет по направлению к основанию мозга. Одновременно с ним в межуточном мозге образуется зачаток в виде воронки. Далее передняя стенка этого зачатка дает начало передней доле гипофиза, часть задней стенки зачатка остается тонкой и превращается в промежуточную часть гипофиза, а другая часть зачатка преобразуется в заднюю долю гипофиза - это ножка гипофиза, состоящая из нейроглии.

В гипофизе выделяют переднюю и заднюю доли, а также промежуточную и туберальную части. При этом 3 из 4 образований (кроме задней доли) входят в состав аденогипофиза - они происходят из эпителия. Задняя доля происходит из межуточного мозга, поэтому ее называют нейрогипофизом. Передняя доля гипофиза производит: АКТГ

(стимулирует глюкокортикоидную функцию коры надпочечников); ТТГ, который избирательно активирует ЩЖ; ФСГ (стимулирует рост яичников и выработку эстрогенов, а в семенниках - сперматогенез); ЛГ (вызывает овуляцию, образование желтых тел и продукцию ими прогестина, а также стимулирует секрецию молока в грудных железах и активирует продукцию мужских половых гормонов в семенниках); ФСГ и ЛГ объединены общим названием - гонадотропные гормоны; СТГ или гормон роста. Задняя доля гипофиза производит: АДГ, контролирующий реабсорбцию воды, что приводит к уменьшению диуреза и увеличению концентрации мочи (при дефиците АДГ развивается несахарный диабет); вазопрессин, обладающий сильным сосудосуживающим действием, способствующий повышению артериального давления крови; окситоцин, близкий по химическому составу к вазопрессину, но специфически действующий на миометрий (стимулирует сокращение матки) и усиливающий лактацию (так же как пролактин). Промежуточная часть гипофиза производит МЦСГ или интермедин. Он увеличивает объем пигментных клеток (меланофоров), контролирует окраску кожных покровов тела, адаптацию клеток сетчатки глаз к сумеречному зрению, а также участвует в активации коры надпочечников.

Эпифиз

Эпифиз, или шишковидная железа, расположен в борозде между передними буграми четверохолмия. В эмбриогенезе эпифиз - это выпячивание крыши межуточного мозга (эпендимы III желудочка). Из этого же источника, но кзади от эпифиза - на нижней поверхности задней комиссуры (как ее утолщение) - закладывается субкомиссуральный орган (входит в состав эпифиза).

В эпифизе вырабатываются гормоны, выделяемые в эпиталамическую область III мозгового желудочка. Это серотонин и меланотонин, являющиеся производными триптофана - аминокислоты, которая сначала превращается в серотонин, а из него в мелатонин (вызывает уменьшение объема пигментных клеток). Мелатонин является антагонистом МЦСГ, вырабатываемого в промежуточной части гипофиза. Эпифиз также угнетает гонадотропную функцию передней доли гипофиза (особенно ЛГ), а в случае блокады этой функции наступает преждевременное половое созревание (см. главу 16). Развитие эпифиза продолжается до 7-летнего возраста, после чего начинается инволюция, сопровождающаяся появлением «мозгового песка» в виде фосфатов и кальцинатов со следами магния.

Тимус

Тимус, или вилочковая железа - это густо инфильтрированный лимфоцитами микроэпителиальный орган (см. главу 15). Сквозного тока лимфатической жидкости через ткань тимуса нет, т.е. это «слепой» орган. Лимфатические сосуды тимуса представлены капиллярной сетью, начинающейся в междольковых соединительнотканых септах. Тимус развивается из четырех зачатков III и IV пар жаберных карманов. На 6-8-й нед беременности эти зачатки становятся дольчатыми и в них вырастают соединительнотканые перегородки с кровеносными сосудами. Одновременно в дольках тимуса происходит дифференцировка на мозговую и корковую части (последняя обильно инфильтрирована лимфоцитами). Приблизительно с 10 нед беременности начинается дифференцировка секреторных клеток железы и исчезает типичная эпителиальная структура. Формирование тимуса завершается к концу 16 нед беременности, когда в мозговом веществе появляются слоистые эпителиальные тельца Гассалья (их количество и размеры с возрастом увеличиваются). Корковое вещество долек тимуса инфильтрировано малыми лимфоцитами (основная масса), нейтрофилами, эозинофилами и тучными клетками. Здесь же присутствуют гемоцитобласты - источники лимфоцитов, а иногда встречаются очаги экстрамедуллярного лимфопоеза.

Мозговое вещество тимуса содержит небольшое количество лимфоцитов, многоядерных клеток слияния, крупных светлых клеток и способных к фагоцитозу макрофагов (как в корковом веществе).

Максимального развития тимус достигает в детском возрасте. Этот период совпадает с периодом быстрого роста тела ребенка. После полового созревания рост железы замедляется, и уже к 25 годам жизни начинается возрастная инволюция. С этого возраста прекращается рост тела (чему способствует эффект снижения уровня СТГ и уменьшается количество лимфоцитов в корковой части тимуса).

От необратимой возрастной инволюции следует отличать обратимую акцидентальную инволюцию тимуса, вызываемую действием инфекций, интоксикаций, черепно-мозговыми травмами и голоданием. По-видимому, в ее основе лежит нарушение баланса между корковой и мозговой частями паренхимы тимуса. Вилочковая железа тесно связана с корой надпочечников, поэтому при развитии надпочечниковой недостаточности тормозится акцидентальная инволюция тимуса, а при гиперсекреции коры надпочечников она, наоборот, ускоряется (механизм обратной связи).

Тимус продуцирует тимулин, тимопозтин, альфа- и бета-тимозин, стимулирующий лимфопоез в лимфатических органах. При действии этих гормонов усиливается дифференцировка лимфатических органов и клеток, способность к антителообразованию. Одновременно стимулируется пролиферация клеток эпителия тимуса, которые внедряются в окружающую соединительную ткань, способствуя инволюции железы (см. главу 15).

Щитовидная железа

Зачаток ЩЖ появляется на 3-4 нед беременности как выпячивание вентральной стенки глотки между I и II парами жаберных карманов у основания языка. Из этого выпячивания формируется щитовидно-язычный проток, который превращается в эпителиальный тяж, растущий вниз вдоль передней стенки.

К 8 нед развития дистальный конец эпителиального тяжа раздваивается (на уровне III-IV пар жаберных карманов) и из него начинают формироваться правая и левая доли ЩЖ,

располагающиеся спереди и по бокам трахеи, поверх щитовидного и перстневидного хрящей гортани.

Проксимальный конец эпителиального тяжа в норме атрофируется, и от него остается только перешеек, связывающий доли ЩЖ. В зачаток ЩЖ вырастают ульtimoбранхиальные тельца или К-клетки, которые в дальнейшем будут секретировать тиреокальцитонин.

Специфическая деятельность секреторных клеток железы появляется уже на стадии зародыша: они активно поглощают радиоактивный йод. ЩЖ иннервируется симпатическими волокнами, отходящими от верхних ганглиев шейного пограничного ствола и ганглиев сонного сплетения, - они стимулируют функциональную активность клеток железы. Парасимпатические волокна идут от блуждающего нерва и заканчиваются в интрамуральных ганглиях паренхимы железы - они тормозят ее активность. Кроме того, к ЩЖ идут волокна языкоглоточного и подъязычного нервов (II и III пары черепно-мозговых нервов), исходящие из центральных отделов вегетативной нервной системы (см. главу 13).

Щитовидная железа начинает функционировать на 6-8 нед беременности, о чем свидетельствует появление тиреоглобулина в сыворотке крови плода. На 10 нед ЩЖ приобретает способность захватывать йод, а к 12 нед в ней начинается секреция тиреоидных гормонов и запасание коллоида в фолликулах. Начиная с 12 нед в сыворотке

плода постепенно увеличивается концентрация ТТГ, тиреоглобулина, общего и свободного Т₄ и Т₃, и так продолжается до 36 нед, когда уровни этих гормонов достигают уровней взрослого организма.

В организме ЩЖ регулирует обмен веществ, осуществляет терморегуляцию, усиливает дифференцировку нейронов мозга (ее гормоны избирательно накапливаются в диэнцефальной области), а также рост скелета (эндохондриальное окостенение).

Влияние тиреоидных гормонов на рост и дифференцировку разных тканей, органов и систем организма трудно переоценить. Им принадлежит первостепенная роль в формировании и функциональном созревании нервной системы плода, новорожденного и ребенка первого года жизни. В последние годы было установлено, что из 20 тыс. генов генотипа человека, участвующих в формировании ЦНС, примерно 200-300 генов регулируются гормонами ЩЖ, и это именно те гены, которые непосредственно влияют на развитие структуры и функций ЦНС. Следует отметить, что в ходе нейроонтогенеза были выделены три критических периода, связанных с участием гормонов ЩЖ. Наиболее ответственным является первый триместр беременности, в котором происходит закладка и созревание нервных элементов с участием материнских тиреоидных гормонов.

Первый критический период длится от момента зачатия до начала синтеза тиреоидных гормонов ЩЖ плода. Он определяется влиянием материнских гормонов в течение 10-12 нед внутриутробной жизни плода, когда происходит закладка нейронов ствола и полушарий головного мозга. При этом гормоны материнской ЩЖ начинают реализовывать свои эффекты на плод до формирования зрелой плаценты и фетальной ЩЖ.

Второй критический период приходится на время продукции гормонов ЩЖ плода, начиная со второго триместра беременности и до момента рождения ребенка. В этом периоде наблюдается прогрессирующее созревание нервных клеток, формируются их аксоны и дендриты, закладываются синаптические связи между ними (передний мозг и ствол), созревают клетки мозжечка. При всех процессах установлено прямое

стимулирующее участие не только зародышевых, но и материнских тиреоидных гормонов.

Третий критический период или время окончательного формирования ЦНС, длится в течение первых 6 мес постнатальной жизни. В этот период продолжается формирование нейроглии (глиогенез), заканчивается миелинизация аксонов и дендритов нейронов

(см. главу 13). Все эти процессы требуют наиболее полноценного обеспечения организма новорожденного гормонами ЩЖ, как вырабатываемыми им самим, так и поступающими к нему с молоком матери.

ЩЖ вырабатывает следующие гормоны: тироксин, моноидтирозин, диидтирозин и триидтиронин. В их состав входит йод. Эти гормоны образуют совместно с белками сложный гликопротеидный комплекс - тиреоглобулин, который в виде коллоида накапливается в фолликулах железы. Коллоид содержит большое количество йода и РНК. Кроме того, в ЩЖ вырабатывается не содержащий йода тиреокальцитонин, который вызывает снижение концентрации в крови ионов Ca^{2+} и является антагонистом паратиреоидного гормона, повышающего уровень кальция. Гормогенез в ЩЖ начинается с окисления йодита (поступает с кровотоком), преобразующегося в атомарный йод (I_2). Один атом йода соединяется с тирозином, давая начало моноидтироzinу, а второй атом йода превращает тирозин в диидтирозин. Далее идет комплексация образовавшихся продуктов в триидтиронин или T_3 (одна молекула моноидтирозина + две молекулы диидтирозина) и тетраидтирозин, или T_4 (две + две молекулы диидтиронины). После завершения гормогенеза эти комплексы включаются в состав тиреоглобулина, чему способствует наличие РНК. Топографически ЩЖ соприкасается с парашитовидными железами и имеет с ними общую иннервацию и васкуляризацию.

Парашитовидные железы

ПЩЖ являются парным органом и имеют крайне важное значение - без них организм нежизнеспособен. Причиной гибели служит дефицит или полное отсутствие ионов Ca^{2+} , что приводит к перевозбуждению нервно-мышечной системы, вызывает судороги, тетанию и смерть.

У зародыша ПЩЖ развиваются одновременно с вилочковой железой из зачатков жаберных карманов, поэтому их называют бранхиогенными железами. Сначала (примерно на 16-18 день беременности) на стенках воронкообразно расширенной глоточно-кишечной трубки появляются 5 пар слепых мешковидных выступов - глоточных карманов. На 6 нед беременности от концов зачатков III и IV пар жаберных карманов обособляются по два эпителиальных выроста: вентральный (зачаток тимуса) и дорсальный (зачаток ПЩЖ).

В свою очередь, V пара жаберных карманов дает начало ультимобранхиальным тельцам - источникам К-клеток в ЩЖ.

ПЩЖ вырабатывают два не содержащих йода гормона: *первый* - паратиреоидный гормон, состоящий из капель (глыбок) липидов, жиров и гликогена. При дефиците в крови ионов Ca^{2+} эти глыбки увеличиваются в объеме, и в ПЩЖ начинает вырабатываться *второй* паратиреоидный гормон - кальцитонин (см. выше ЩЖ). При этом заметно возрастает количество ацидофильных клеток, что является признаком старения секреторных клеток (появление дегенеративных форм).

Надпочечники

Надпочечники являются парными органами. В каждом надпочечнике две части: корковая и мозговая. Они имеют разное происхождение и строение, но в ходе филогенеза

объединились в единый орган. Мозговая часть производит адреналин и норадреналин. Кортикальная часть производит стероидные гормоны: минералокортикоиды, глюкокортикоиды, андрогены (тестостерон), эстрогены и прогестерон.

Минералокортикоиды (альдостерон) влияют на водно-солевой обмен (контролируют уровень натрия в крови), усиливают воспалительные процессы и способствуют образованию коллагена.

Глюкокортикоиды (кортикостерон, гидрокортизон, кортизон) стимулируют фосфорилирование, влияют на обмен углеводов и повышают сопротивляемость организма к воздействиям факторов окружающей среды. Их избыток ведет к массовому распаду лимфоцитов, вызывая лимфопению и эозинопению. Одновременно глюкокортикоиды уменьшают проницаемость капилляров, ослабляют фагоцитоз, подавляют образование коллагена и, следовательно, воспалительную реакцию и формирование рубцовой ткани. Совместно с андрогенами глюкокортикоиды относятся к адренокортикоидным гормонам, источником которых служит холестерин. Кортикальная часть развивается на 5 нед беременности как выпячивание целодермального эпителия (мезотелия) по обе стороны корня брыжейки. Из них образуются интерреналовые тела, являющиеся не только зачатками корковой части надпочечников, но и гонад, что объясняет химическое сродство между адренокортикальными и половыми гормонами. Особенностью формирования железистых клеток коры надпочечников является строение их митохондрий. Внутренняя мембрана митохондрий образует кристы в виде трубочек, находящихся в

пучковой зоне коры. В них протекает синтез стероидных гормонов. Здесь же локализованы ферменты, обеспечивающие превращение холестерина в прегненолон, секреция которого усиливается под влиянием АКТГ гипофиза.

В коре надпочечников выделяют клубочковую, пучковую и сетчатую зоны, каждая из которых обладает относительной автономностью. В них вырабатываются гормоны, различающиеся как по химическим, так и по физиологическим характеристикам. Продуктами клубочковой зоны являются минералокортикоиды - их производство идет в малодифференцированных клетках, расположенных под капсулой между пучковой и сетчатой зонами. Пучковая зона производит глюкокортикоиды, а сетчатая зона - стероиды, которые по действию схожи с половыми гормонами.

Немного позже начала развития корковой части развивается мозговая часть надпочечников. При этом из эмбриональных структур спинного мозга к будущим симпатическим ганглиям мигрируют нейробласты, которые дифференцируются в симпатобласты и хромаффинобласты. Симпатобласты - это будущие симпатические ганглии и параганглии (аортальные и брюшные, солнечного сплетения, пограничного симпатического ствола, каротидных телец, почек, матки, семенников). Хромаффинобласты - это будущие хромаффинные клетки.

На 6 нед беременности часть хромаффинобластов перемещается к интерреналовым телам и, внедряясь в них, образует мозговое вещество надпочечников. С этого момента хромаффинобласты производят адреналин.

Между хромаффинными клетками расположены окончания аксонов симпатических нейронов. Таким образом, для мозговой части надпочечников характерно невральное происхождение, т.е. это измененные симпатические ганглии. Угнетение функций коры и мозговой части надпочечников ведет к надпочечниковой недостаточности, гормональным, метаболическим, неврологическим, сердечно-сосудистым нарушениям, а также нарушениям развития и функционирования репродуктивных органов.

Поджелудочная железа

Поджелудочная железа (ПЖ) - это орган со смешанной экзокринной и эндокринной функцией. *В первом случае* она вырабатывает панкреатический сок, содержащий ряд специфических

ферментов, расщепляющих жиры, белки и углеводы (амилаза, карбоксилаза, липаза, трипсин, химотрипсин и др.). *Во втором случае* в ней вырабатываются 3 гормона: инсулин, регулирующий углеводный обмен (превращает глюкозу в гликоген) и жировой обмен; глюкагон (превращает гликоген в глюкозу) и липокаическая субстанция, при дефиците которой развивается жировое перерождение печени, так как эта субстанция поддерживает уровень липидов в крови.

ПЖ развивается на 3-4 нед беременности из дорсального и двух вентральных выпячиваний средней (туловищной) части кишечной трубки, которые внедряются в мезодермальную оболочку и прорастают в спинную брыжейку. В дальнейшем из дорсальной закладки формируются тело и хвост железы, а из вентральной - основная часть железы (головка и выводной проток).

Дифференцировка островков секреторных клеток железы начинается на 4 нед и продолжается до 5 мес беременности. Эти островки (их число 0,2-1,8 млн) дифференцируются на 3-м месяце развития и созревают к моменту рождения. Среди них выделяют: периферические бета-клетки - 70%, центральные ацидофильные А-клетки - 20%, переходные ацидоостровковые клетки (содержат зимоген и другие гранулы) - их 5%, а также С- и Д-клетки - 5%. ПЖ иннервируется окончаниями блуждающего нерва и симпатических нервов, а ее секреторные островки иннервируются поверхностными сплетениями (нервно-инсулярными комплексами). Нарушения эндокринной и экзокринной функций ПЖ ведет к сахарному диабету (см. главу 22) и муковисцидозу (см. главу 21).

Гонады

Гонады или половые железы вырабатывают гормоны, осуществляющие эндокринную и генеративную функции (первая создает условия для второй). Их онтогенез как основных участников репродуктивного процесса и связанные с ними нарушения дифференцировки пола, а также мужское и женское бесплодие, описаны в главе 16.

Секреторные железы и клетки других систем и внутренних органов

Экзокринной, эндокринной или смешанной функциями обладают секреторные железы и клетки железистых тканей других систем

и внутренних органов. Среди них: иммунная система (см. главу 15); кожная ткань (см. ниже); печень, вырабатывающая соматомедины, или инсулиноподобные факторы роста: IGF I и IGF II, для которых тканями-мишенями служат ткани самой печени и костная ткань; пилорические железы желудка (вырабатывают компоненты желудочного сока); клетки железистых тканей слизистых оболочек: амниона (см. ниже), тонкого кишечника (вырабатывают компоненты кишечного сока), органов дыхания (компоненты слизи), плаценты (см. ниже), почек, простаты (см. главу 16) и пупочного канатика (см. ниже).

Секреторные клетки кожной ткани

Кожная ткань (кожа) - это уникальная многофункциональная система, обладающая барьерной, нейроэндокринной и иммунной функциями, защитными ферментативными функциями (системы свертывания крови и детоксикации с участием цитохрома P₄₅₀),

терморегулирующей, выделительной и, вероятно, другими, пока еще мало изученными функциями, обеспечивающими, с одной стороны, взаимодействие с внешней средой, а с другой стороны - взаимодействие с внутренней средой организма.

По происхождению кожная ткань имеет общий зародышевый источник с нервной тканью (эктодерма), что во многом объясняет наличие сочетанных поражений кожи и нервной системы, а также внутренних органов и кровеносных сосудов (и те, и другие происходят из мезодермы) при ряде нейрокожных заболеваний и факоматозов (эктомезодермальных дисплазий). Кожа - это важный экзокринный орган, через потовые железы которого выводится избыточная внутриклеточная и межклеточная жидкость и «шлаки» организма (до 200 вредных и частично полезных микроэлементов), при этом осуществляется теплообмен.

Кожа - это важный эндокринный и иммунный орган, антигенпрезентирующие клетки которого способны к медиаторной активности Т- и В-лимфоцитов; ее белые отростчатые эпидермоциты самостоятельно продуцируют такие медиаторы, а тучные клетки дермы вырабатывают антитела. Ведущую роль в осуществлении эндокринной функции, безусловно, играют креатиноциты, вырабатывающие эпидермальный тимоцит-активирующий фактор (ЕТАФ), обладающий хемотаксической активностью к гранулоцитам, стимулирующий пролиферацию фибробластов кожи и выработку интерлейкина-1 антигенпрезентирующими клет-

ками с развертыванием активации Т-хелперов и В-лимфоцитов (см. главу 15).

Кроме того, креатиноциты стимулируют синтез тимопоэтина и тимических факторов.

Показано, что анатомическое сходство креатиноцитов кожи с клетками кортикального эпителия тимуса допускает возможность миграции в кожу и постоянного пребывания в ней недифференцированных лимфоцитов (здесь они окончательно дифференцируются). В частности, такой механизм лежит в основе формирования злокачественных Т-клеточных лимфом кожи, а возможно, и саркомы Капоши при СПИДе.

Плацента, амнион и пупочный канатик

Плацента включает зародышевую и материнскую части. Первая часть образована ворсинчатым хорионом, вторая происходит из слизистой оболочки матки. В зародышевой части выделяют хориальную пластинку и хориальные (якорные) ворсинки.

Функции плаценты: снабжение кислородом, трофическая, защитная (от микробов, вирусов и токсинов), секреторная (вещества, близкие к ЛГ), резервная (депо углеводов, витаминов, минеральных солей и др.).

Амнион вырабатывает околоплодные воды, обеспечивающие плоду необходимую (оптимальную) окружающую среду, предохраняющую его от механических повреждений, а также от проникновения со стороны матки вредных веществ. Последняя функция обеспечивается за счет изменяющейся вязкости основного вещества амниона - рыхлой волокнистой соединительной ткани амниотической оболочки.

Пупочный канатик образуется из мезенхимы, находящейся в зародышевой ножке и желточном стебельке, а также из желточного мешка и аллантоиса с растущими к нему сосудами. Желточный стебелек, желточный мешок и аллантоис быстро редуцируются (в пуповине новорожденного обнаруживаются только их остатки). Поверхность канатика покрыта амниотической оболочкой. В состав канатика входят две пупочные артерии, одна пупочная вена, нервная и соединительная ткань. В соединительной ткани канатика много

высокополимерной гиалуровой кислоты (вартонов студень), обеспечивающей его упругость.

ОСНОВНЫЕ ЭНДОКРИНОПАТИИ

Нарушения функционирования желез внутренней секреции - это эндокринопатии. Они обусловлены неотделимыми друг от друга гормональными и метаболическими нарушениями, имеющими прямое отношение к энергетическим превращениям, межмолекулярным взаимодействиям, синтезу и распаду химических молекул. Такого рода нарушения постоянно происходят в течение жизни организма во всех его клетках, тканях, органах и системах при участии многочисленных посредников: белков-ферментов, гормонов, нейрогормонов, трансммиттеров, медиаторов и других веществ.

В одних случаях - это временное отражение морфофункциональной незрелости или нарушение гомеостаза в системе мать-плацента- плод, наблюдаемое у матери при предшествующих беременности соматических заболеваниях, включая эндокринопатии.

В других случаях - это временные или транзиторные нарушения, связанные с физиологической адаптацией новорожденного к новым условиям внешней среды.

В третьих случаях - это стойкие наследственные и врожденные нарушения при эндокринопатиях. Рассмотрим основные нарушения.

Аntenатальные гормональные и метаболические нарушения

Во внутриутробном периоде у плода активны все железы внутренней секреции. Они формируются (и обучаются навыкам функционирования) под контролем генов материнской эндокринной системы, но непосредственно контролируются тропными гормонами гипофиза самого плода, сверяющего свои действия с действиями материнского организма в системе плод-плацента-мать (см. главу 12).

Первые проявления активности метаболизма в аденогипофизе зародыша заметны с 7-8 нед беременности. В 10-12 нед его активность усиливается (что совпадает по времени с ранним фетальным периодом), а при сроках 13-19 нед активность аденогипофиза снижается и затем снова возрастает, так как в это время завершается структурная дифференцировка фетального аденогипофиза (15-17 нед).

Максимальная активность аденогипофиза приходится на 26-35 нед беременности. Далее опять наступает угасание активности метаболических процессов, так как идет подготовка к родам, сопровождающаяся постепенно нарастающей физиологической гипоксией.

Во внутриутробном онтогенезе материнский аденогипофиз увеличивается вдвое за счет развития клеток беременности - лактофоров или пролактинсекретирующих клеток, развивающихся из хромофобных клеток. При этом в задней доле материнского гипофиза активируются питуициты.

Таким образом, плод развивается в условиях перестройки функций материнского гипофиза и появления новой эндокринной железы - плаценты. В это время в крови беременной повышается концентрация пролактина, соматотропного и тиреостимулирующего гормонов, окситоцина и вазопрессина.

В конце III триместра беременности в крови плода снижается уровень СТГ и увеличивается уровень прогестерона. В материнской крови соответственно увеличиваются концентрации гормонов плода - АКТГ, эстрогена и ХГ - и благодаря этому снижаются уровни материнских гормонов - АКТГ, ФСГ и ЛГ.

Следовательно, для оценки гормональных функций плода важное значение имеет оценка гормонального статуса матери, так как в конце беременности плацентарный барьер становится проницаемым для многих гормонов. Именно поэтому нарушения эндокринных функций у беременных являются факторами риска развития у плода и новорожденного перинатальной патологии, включая эндокринопатии.

Транзиторные гормональные и метаболические нарушения в раннем постнатальном онтогенезе

Неонатальный период жизни новорожденного по характеру изменений концентрации в его крови основных гормонов можно разделить на три фазы.

Первая фаза (первые 2-3 ч жизни) - в это время наблюдаются высокие концентрации материнских и плацентарных гормонов, входящих в «материнский коктейль» (прогестерон, эстриол и кортизол), и гормонов плода (тироксин, трийодтиронин, тиротропин и соматотропин) - см. главу 12.

Вторая фаза. Приходится на конец 1-3 суток. В это время в крови снижается концентрация материнских и плацентарных гормонов и одновременно растет концентрация гормонов новорожденного, особенно трийодтиронина (Т₃) и тетрайодтирозина (Т₄).

Третья фаза. Приходится на 4-6 сутки. В это время наблюдается значительное снижение уровней материнских и плацентарных

гормонов (эстриола - в 50 раз, кортизола - в 9 раз) и происходит стабилизация уровней тиреоидных гормонов.

Рассмотрим основные эндокринные нарушения неонатального периода жизни организма.

Для адаптации новорожденного к новым условиям окружающей среды необходима нормальная легочная вентиляция, которую может обеспечить только зрелая легочная ткань, активно синтезирующая под влиянием гормонов коры надпочечников специфическое вещество - сурфактант.

Синдром дыхательной недостаточности

У беременных с фетоплацентарной недостаточностью (ФПН) наблюдается дефицит стероидных гормонов, поэтому для детей, рожденных от таких матерей, крайне высока вероятность проявления синдрома дыхательной недостаточности (СДН), развивающегося из-за незавершившейся дифференцировки альвеолярного эпителия и слабой выработки сурфактанта.

Кроме того, с СДН тесно связана гипофизарная и надпочечниковая недостаточность у беременной с сахарным диабетом, изосерологической несовместимостью, длительным поздним токсикозом, недоношенной или переношенной беременностью. У таких беременных в крови также значительно снижена концентрация фосфолипидов (коррелирует с концентрацией сурфактанта).

Синдром гормонального криза

В неонатальном периоде у 60% новорожденных может развиваться синдром гормонального криза (СГК). Проявлениями этого клинического синдрома являются: генитальный криз, миниатюрная возмужалость, «малый пубертат» и другая симптоматика, которая считается закономерной временной реакцией гормонзависимых органов новорожденного

в ответ на резкое изменение для него гормональной ситуации, связанной с лишением эстрогенов, уровень которых до этого нарастал.

Вместе с тем, суммарное действие тироксина, инсулина, андрогенов проявляется активацией пролактина. СГК может сохраняться в течение первых двух недель жизни в виде нагрубания молочных желез, гиперпигментации и отека половых органов, гипертрихоза и даже младенческих угрей.

Транзиторный гипотиреоз у недоношенных детей

У 85% недоношенных детей встречается транзиторный гипотиреоз (ТГ), проявление которого связано со степенью недоношенности

(сроком беременности) и задержки психомоторного развития и при этом не поддается коррекции тиреоидными гормонами. Причинами ТГ у новорожденного могут быть:

- антитиреоидная терапия тиреотоксикоза у матери;
- воздействие избытка йода на плод или новорожденного - в этом случае развивается транзиторный гипотиреоз Вольфа-Чайкова.

Возможные причины:

- передозировка йодсодержащих препаратов при лечении беременной, амниография с йодсодержащими контрастными препаратами, обработка шейки матки йодсодержащими веществами (например, при преждевременном разрыве плодных оболочек), прижигание культи пуповины йодсодержащими препаратами;
- трансплацентарный перенос материнских тиреоблокирующих антител;
- йодная недостаточность у матери, проживающей в эндемичном по йоду регионе, - в этом случае у новорожденного отмечается задержка развития;
- снижение уровня гормонов ЩЖ в случае рождения ребенка женщиной, имевшей ФПН (см. выше), нарушение плацентарного кровообращения и оксигенации плода, ведущее к преждевременным родам, внутриутробной гипотрофии и недоношенности.

Тиреоидные гормоны матери проходят в кровь плода через плаценту, поэтому, например, для T_4 , повышение его концентрации в сыворотке новорожденных до 50% может быть обусловлено гормоном материнского происхождения.

Таким образом, материнские тиреоидные гормоны участвуют в регуляции развития плода еще до созревания у него гипоталамогипофизарно-тиреоидной системы. Более того, материнские гормоны защищают плод от гипотиреоза вплоть до родов (но не обеспечивают нормальную концентрацию T_4 в крови плода).

Существует и другой механизм внутриутробной защиты от гипотиреоза - это ускоренное превращение T_4 в T_3 за счет повышения активности 6-дейодиназы в головном мозге плода.

Для детей с патологическим течением внутриутробного периода характерно высокое содержание ТТГ сразу после рождения ребенка и запоздалое исчезновение (снижение) у него адаптационного подъема - синдром нарушения ранней постнатальной адаптации. В частности, у большинства таких детей транзиторные нарушения проходят к концу второй недели жизни, а иногда (при выраженной

форме ФПН) гормональный статус нормализуется к концу первого месяца жизни. В отличие от транзиторного гипотиреоза у недоношенных детей, такой гипотиреоз у

доношенного плода встречается редко, хотя и может быть обусловлен агенезией или дисгенезией ЩЖ, наследственными дефектами синтеза тиреоидных гормонов, аутоиммунными заболеваниями ЩЖ у матери (из-за проникновения тиреоблокирующих антител через плаценту), лечением тиреотоксикоза у матери антитиреоидными средствами или радиоактивным йодом.

Наличие гипотиреоза у плода можно определить, измеряя содержание ТТГ, T_4 и T_3 в пуповинной крови.

ВРОЖДЕННЫЙ И ПРИОБРЕТЕННЫЙ ГИПОТЕРИОЗ

Врожденный гипотиреоз (ВГ) представляет собой одну из наиболее распространенных форм болезней ЩЖ у детей, сопровождающуюся нарушениями формирования скелета, задержкой развития психоневрологических функций и другой симптоматикой, которые поддаются коррекции, если лечение начать в первые 3 мес жизни ребенка.

При некомпенсированном ВГ у детей резко нарушается формирование скелета (запоздалое окостенение и закрытие эпифизарных щелей, задержка прорезывания зубов), выявляются брахицефалия, прогнатизм, широкое лицо, плоский нос, глубоко западающая переносица и другая симптоматика. ВГ выявляется у новорожденных, в дальнейшем он может сопровождаться или не сопровождаться диффузным тиреотоксическим зобом (ДТЗ), кретинизмом (УО), нанизмом (низкорослость в сочетании с аномалиями развития пола) и микседемой (слизистый отек).

Приобретенный гипотиреоз выявляется в любом возрасте и сопровождается аплазией или гипоплазией тиреоидной ткани.

Врожденный и приобретенный гипотиреоз делится на:

- первичный, при котором патологический процесс развивается непосредственно в ЩЖ; его частота - 1:3500 новорожденных;
- вторичный или гипофизарный - это деструктивные процессы в гипофизе, которые ведут к нарушениям синтеза ТТГ и, как правило, являются следствием опухолей (хромобластная аденома, краниофарингиома) или сосудистых нарушений; его частота 1:25 000; как известно, под влиянием ТТГ гипофиза происходит протеолитическое расщепление коллоида - тиреоглобулина и освобождение T_4 и T_3 ;
- третичный - это повреждение гипоталамуса, продуцирующего

ТТРГ; его частота 1:250 000.

Вторичный и третичный гипотиреоз часто сопровождается выпадением гонадотропной и реже - адренокортикотропной функций гипофиза. В случае генетически обусловленных дефектов нарушается биосинтез тиреоидных гормонов. При этом гормоны T_3 и T_4 влияют на различные метаболические процессы в клетках и тканях, онтогенетическое развитие центральной и периферической нервной системы, рост и дифференцировку клеток, тканей, формирование скелета, а также оказывают на них «калоригенное» действие (способствуют выделению энергии в виде тепла).

Общие причины (суммарно генетические и негенетические) гипотиреоза: аплазия, гипоплазия, дисгенезия и эктопия ЩЖ (см. главу 17); нарушение синтеза, секреции или периферического метаболизма тиреоидных гормонов.

Генетические причины гипотиреоза следующие.

- Дисгенезия ЩЖ (характерна для 80-90% случаев первичного ВГ). Чаще всего (две трети случаев) встречается эктопическое расположение железы, реже - гипоплазия или аплазия. И хотя все случаи дисгенезии ЩЖ спорадические, предполагается, что дисгенезия может быть следствием аутоиммунного тиреоидита у плода. Эта гипотеза подтверждается наличием цитотоксических анти tireоидных антител в сыворотке крови новорожденных с первичным гипотиреозом.
- Генетические дефекты синтеза, секреции и периферического метаболизма тиреоидных гормонов выявляются у 3-10% новорожденных с гипотиреозом. Тип наследования аутосомно-рецессивный.
- Дефекты рецепторов ТТГ на клетках железы; встречаются редко. Еще реже встречается ситуация, когда сами рецепторы ТТГ нормальные, но фермент аденилатциклаза после связывания ТТГ с рецептором не активируется - это пострецепторный дефект.
- Нарушение транспорта йода; встречается редко. Этот дефект обусловлен неспособностью йодного насоса клеток ЩЖ - тироцитов - захватывать йодиды из крови, переносить их через мембрану и концентрировать в цитоплазме.
- Недостаточность йодидпероксидазы (тиреопероксидазы) - самый частый дефект синтеза тиреоидных гормонов. Ген тиреопероксидазы локализован на коротком плече хромосомы 2 (2p16.1). Из-за недостаточности этого фермента йодит не окисляется до

нейтрального йода, йод не связывается с остатками тирозина в тиреоглобулине, и потому не образуются предшественники тиреоидных гормонов - монойодтирозин и дийодтирозин.

- Нарушения образования T_4 или T_3 ; встречаются редко.
- Дефекты тиреоглобулина или процесса его гидролиза; встречаются редко. Ген тиреоглобулина локализован на хромосоме 8 (8q24). Структурные дефекты тиреоглобулина или недостаточность протеаз, гидролизующих тиреоглобулин, нарушают отщепление T_4 и T_3 от молекулы тиреоглобулина и их поступление в кровь.
- Недостаточность 5'-дейодиназы; встречается редко. Нарушение дейодинирования монойодтирозина и дийодтирозина в тироцитах препятствует повторному использованию йода ЩЖ.

Таким образом, наблюдается гетерогенность генетических причин ВГ. В настоящее время идентифицирован ряд точковых мутаций, проявляющихся как генокопии ВГ; часть генов картирована на аутосомных хромосомах. Например, одна из форм первичного ВГ («классическая форма») обусловлена мутацией гена, локализованного в 8q24.3.

Формы незобного гипотиреоза обусловлены мутациями генов в хромосомах 1 (1p13.1) и 14 (14q31). Йодтиреоидная недостаточность ЩЖ связана с сегментом 2p16.1 (см. выше), а резистентность к тиреоидному гормону - с сегментом 3p25.3. Одна из форм болезни, обусловленная нарушением связывания в железе органического йода и сочетающаяся с глухотой, получила название синдром Пендреда.

Фенокопией ВГ является эндемический зоб, обусловленный дефицитом неорганического йода, поступающего в организм с пищей и водой. Эта фенокопия встречается в дефицитных по йоду (эндемичных) регионах разных стран.

Отдельно выделяют внутритиреоидные и внетиреоидные молекулярные нарушения (генетические и биохимические).

Внутри tireоидные:

- снижение чувствительности рецепторов тиреоидной ткани к ТТГ;
- нарушение транспорта йода;
- сниженная активность тиреоидной пероксидазы, в том числе замедление превращения I^- в I^+ и замедление конденсации или сниженное образование перекиси водорода;
- аномалии тиреоглобулина, в том числе нарушения: синтеза белка, секреции фолликулов, резорбции, резистентности к действию протеаз;
- недостаточность внутри tireоидной дейодиназы и связанные с ней потери моно- и дийодтирозина с мочой.

Вне tireоидные:

- снижение секреции и неэффективность ТТГ;
- нарушение процессов транспорта гормонов щитовидной железы;
- нарушение дейодирования с образованием T_3 в периферических тканях;
- сниженная чувствительность тканей-мишеней к T_3 и T_4 .
- избыточная потеря T_3 и T_4 из-за повышения скорости их метаболизма и экскреции.

Клинические симптомы врожденного и приобретенного гипотиреоза (помимо указанных выше признаков некомпенсированного гипотиреоза) проявляются как симптомы поражения ЦНС: замедление психической реакции в ответ на внешние раздражители, снижение способности концентрировать внимание, ухудшение памяти, вялость, сонливость, апатичность. Редко развиваются нарушения сна, повышенная возбудимость, беспокойство, но постоянны гипорефлексия, невралгии, нарушения обоняния и вкуса, парестезии.

Также отмечаются одутловатость и отеки лица и конечностей, грубый и хриплый голос, брадикардия и глухость тонов сердца, снижение систолического давления крови, анемия, замедленное дыхание, снижение аппетита, слабая перистальтика кишечника и запоры, сухость кожных покровов, ломкость и выпадение волос. Отставание в психическом развитии ведет к тяжелой идиотии. С возрастом становятся заметными задержка развития половых желез и склонность к атеросклеротическим изменениям. Специфический симптом - микседема или слизистый отек. Это экстрацеллюлярное накопление жидкости в разных тканях и органах (кожа, скелетная мускулатура, перикард и др.), а также мукополисахаридов, повышающих гидрофильность тканей.

Проблемы клинической диагностики и лечение врожденного гипотиреоза

Клиническая диагностика ВГ затруднена в первые 3 мес жизни ребенка. В этот период точная диагностика ВГ возможна не более чем в одной трети случаев (из-за скудности клинических проявлений), тогда как вероятность ДНК-диагностики ВГ в это время составляет

100%.

И хотя гипотиреоз не всегда является результатом врожденных дефектов метаболизма, его массовый неонатальный скрининг вполне возможен. Программы диагностики на первом этапе обследования (см. главу 18) - это просеивающие массовые скрининг-программы. С их помощью определяют сниженный уровень T_4 в сыворотке крови, что обусловлено дефицитом связывающего этот гормон белка (либо гипопитуитаризмом). Вместе с тем, вероятно, что этот дефект вовсе не влияет на тиреоидную функцию ЩЖ.

Помимо гипотиреоза данный тест выявляет гипофизарную недостаточность. Иногда на первом этапе одновременно определяют уровень ТТГ, но и этот тест дает сбой, и поэтому он менее надежен.

Одновременное выявление уменьшения концентрации T_4 в сочетании с высоким уровнем ТТГ подтверждает диагноз ВГ и является прямым показанием к клиническому обследованию новорожденного. Если выявляется низкий уровень T_4 , а уровень ТТГ соответствует норме, то следует провести повторное их определение на новой фильтровальной бумаге.

При поздней диагностике и несвоевременном лечении ВГ больные дети становятся инвалидами - у них существенно снижены возможности обучения и социальной адаптации.

С организационной точки зрения, здесь необходимо строгое соблюдение последовательности этапов массового скрининга и ряда других требований, включая:

- тщательное пропитывание дисков на бланке с двух сторон;
- исследование элюата крови из диска, имеющего индивидуальный штрих-код, с помощью РИА или ИФА с последующим повторным исследованием в случае положительной пробы (свыше 20 Ме/л);
- обязательное подтверждение диагноза эндокринологом в условиях специализированного диспансера;
- индивидуальный подбор дозы препаратов с учетом клинической и генетической гетерогенности ВГ: 80-90% случаев врожденной гипоплазии аплазии ЩЖ и 10-20% случаев наследственных аутосомно-рецессивных дефектов синтеза гормонов ЩЖ;
- гормональный контроль адекватности заместительной терапии;
- медико-генетическое консультирование семьи с оценкой генетического риска для следующего ребенка в данном браке;
- диспансерное наблюдение и лечение больных детей и других членов семьи;
- формирование регистра на всех выявленных больных с ВГ.

Соблюдение последовательности всех этапов и требований массового скрининга дает возможность ранней диагностики этого заболевания у 100% больных, в том числе у 90% больных детей еще на доклинической стадии.

В то же время, при отсутствии массового скрининга диагноз ВГ в ранней стадии ставится не более чем у 10% больных детей. К сожалению, массовый скрининг в России стал более или менее организованным только в последние годы.

Недостаточная организация работы по проведению массового скрининга новорожденных на ВГ приводит к поздней его диагностике и ранней инвалидизации больных детей.

Лечение ВГ проводится левотироксином в дозе 50 мкг ежедневно.

Если у беременной диагностируется диффузный токсический зоб или рак щитовидной железы, то лечение проводится радиоактивным йодом, начиная с 8-10 нед беременности. В этом случае I^{131} проходит через плаценту и начинает поглощаться ЩЖ плода, разрушая ее. При этом I^{131} может вызывать другие заболевания плода, например стеноз трахеи и гипопаратиреоз.

Лечение гипотиреоза и нефротического синдрома проводится йодидом и йодтирозином (при их потере с мочой на фоне недостаточного питания).

Лечение транзиторного первичного гипотиреоза проводится антитиреоидными средствами.

Для лечения диффузного токсического зоба у беременной применяют тионамиды (например, пропилтиоурацил), которые проходят через плаценту и блокируют синтез тиреоидных гормонов у плода.

Вместе с тем, гипотиреоз у новорожденных наблюдается даже при приеме матерью низких доз пропилтиоурацила (200-400 мг в сутки). Поскольку тионамиды быстро метаболизируются и выделяются из организма, такой гипотиреоз проходит через 1-2 нед после рождения.

Дефицит йода у матери - самая частая причина гипотиреоза у новорожденного в районах с недостатком йода в воде и пище, районах, где встречается эндемический зоб. Если ребенок не получает достаточного количества йода с пищей, гипотиреоз сохраняется и ведет к кретинизму - необратимым нарушениям физического и психического развития.

Различают две клинические формы эндемического кретинизма, которые определяются длительностью и тяжестью постнатального

гипотиреоза:

- *неврологическая форма*: задержка психического развития, атаксия, нарушения походки, пирамидные симптомы, нарушения слуха и речи вплоть до глухонемой; задержка роста наблюдается не всегда; при этой форме клинические признаки гипотиреоза часто отсутствуют или слабо выражены;
- *гипотиреоидная форма*: задержка психического развития, неврологические расстройства, задержка роста и зоб; клинические признаки гипотиреоза четко выражены.

Врожденный гипотиреоз и женское бесплодие

Врожденный гипотиреоз у женщин часто приводит к ановуляторным циклам и бесплодию (см. главу 16). Поэтому частота ВГ у беременных не превышает 0,3%.

Вместе с тем, беременность у женщин, страдающих врожденным гипотиреозом, почти в 50% случаев заканчивается самопроизвольным выкидышем, который можно предотвратить заместительной терапией левотироксином, вводя его в амниотическую полость (250-500 мкг ежедневно вплоть до родов) - этот препарат уменьшает размеры зоба у плода и нормализует концентрации T_4 и ТТГ в пуповинной крови.

ВРОЖДЕННАЯ ГИПЕРПАЗИЯ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Врожденная гиперплазия коры надпочечников (ВГКН) приводит к недостаточности фермента 21-гидроксилазы, что обуславливает развитие адреногенитального синдрома

(АГС), проявляющегося в трех клинических вариантах. Самая частая форма - это сольтеряющая (классическая) форма. Кроме нее, выделяют простую вирилизирующую форму и антенуированную (неклассическую) форму.

Поражаются оба пола. Манифестация АГС приходится на неонатальный период. Частота в популяции составляет у европеоидов

1: 10 000-1: 18 000.

Первичный молекулярный дефект - это точковые мутации структурного гена CYP21 (микросомальный цитохром P₄₅₀ c21), контролирующего синтез 21-гидроксилазы. В результате наблюдается недостаточность этого фермента в коре надпочечников. Ген болезни картирован на хромосоме 6 (6p21.3) между аллелями HLA B и HLA D

в области расположения класса III HLA-комплекса гистосовместимости. Кроме того, сольтеряющая форма ассоциируется с аллелем HLA Bw60 и гаплотипами: HLA-A3, Bw47, DR7.

Наряду с геном CYP21 выделен псевдоген CYP21P - оба они находятся в тандемной дупликации с генами, кодирующими компоненты комплемента C4A-CYP21P и C4B-CYP21, что создает предпосылки для нерцепрокового спаривания и неравного кроссинговера между сестринскими хроматидами в мейозе и ведет к дупликации гена (или его участка) в одной хроматиде и делеции гена в другой хроматиде (см. главу 5). Тип наследования АГС - аутосомнорецессивный.

Основные клинические и биохимические критерии диагностики

А. При сольтеряющей форме АГС:

- «сомнительные» гениталии по мужскому типу у девочек при женском кариотипе: гипертрофия клитора, сращение больших половых губ, губно-мошоночные складки, в которых не пальпируются яички - это женский псевдогермафродитизм; паспортный пол не соответствует биологическому полу (см. главу 16);
- преждевременное развитие вторичных половых признаков по мужскому типу у мальчиков и девочек;
- адреналовый криз; начинается с 3-12 нед жизни ребенка с его отказа от приема пищи; сопровождается рвотой, дегидратацией, спастической диареей, судорогами, летаргией и развитием гипотрофии, нередко переходит в шоковое состояние с остановкой сердца и синдромом внезапной смерти. При соответствующей терапии адреналовый криз с возрастом постепенно проходит;
- первичная аменорея у девушек;
- натрийурез, гипонатриемия и гипохлоремия;
- гиперкалиемический ацидоз;
- увеличение активности ренина в плазме;
- у младенцев обоих полов гиперпигментация наружных гениталий;
- высокое содержание 17-гидрооксипрогестерона в плазме крови и 17-кетостероидов в моче.

Б. При простой вирилизирующей форме АГС:

- «сомнительные» гениталии у девочек при женском кариотипе и нормальные гениталии у мальчиков;

- преждевременное развитие вторичных половых признаков по мужскому типу у мальчиков и девочек: оволосение лобка (6 мес - 2 года жизни), оволосение подмышечных впадин (2-4 года), оволосение лица (8-14 лет), низкий тембр голоса (8-12 лет); у мальчиков иногда наблюдается эрекция в младенческом и даже раннем детском возрасте;

- несоответствие костного возраста и роста паспортному возрасту; низкорослость у взрослых: у женщин рост 140-150 см, мужчин

145-155 см;

- аменорея у девушек при отсутствии соответствующего лечения;

- высокое содержание 17-гидроксипрогестерона в плазме и 17-кетостероидов в моче.

В. При неклассической форме АГС:

- манифестация болезни в пубертатном периоде только у девочек;

- недоразвитие молочных желез у девушек;

- первичная и/или вторичная аменорея и поликистоз яичников;

- оволосение по мужскому типу, включая оволосение лица;

- высокое содержание 17-гидроксипрогестерона в плазме и 17-кетостероидов в моче.

Гетерогенность АГС. Помимо перечисленных выше вариантов синдрома, встречаются:

- недостаточность 3-бета-гидроксистероиддегидрогеназы - мутации структурного гена, локализованного на 1p13 (1% всех случаев);

- недостаточность 11-бета-гидроксилазы или гипертензионная ВГКН в результате мутации структурного гена CYP11B1 митохондриального цитохрома P₄₅₀ c11; ген картирован на 8q21-q22 и тесно сцеплен с геном CYP11B2, контролирующим синтез альдостеронсинтазы (без неравного кроссинговера и делеций гена CYP11B1 - 5% всех случаев);

- недостаточность 17-альфа-гидроксилазы в результате мутации структурного гена CYP17 микросомного цитохрома P₄₅₀ c17, контролирующего синтез 17-альфа-гидроксилазы и 17, 20-лиазы; приводит к их недостаточности в коре надпочечников и гонадах; ген картирован на 10q24.3 - это крайне редкая форма синдрома;

- недостаточность холестеролдесмолазы или липоидная ВГКН - предполагаются мутации структурного гена CYP11A митохондриального цитохрома P₄₅₀ scc, вызывающие сочетанную недостаточность 20-гидроксилазы, 22-гидроксилазы, 20,22-десмолазы в

коре надпочечников, яичниках, тестикулярных клетках Лейдига и плаценте (доказано только на экспериментальных моделях животных); характеризуется этнической принадлежностью (немцы, швейцарцы и японцы).

Патогенетические механизмы АГС. Связаны с блокадой 21-гидроксилазы, что ведет к нарушению гидроксилирования 17-гидроксипрогестерона, изменяющего синтез 11-деоксикортизола - это предшественник кортизола в метаболическом пути биосинтеза глюкокортикоидов, т.е. патогенез АГС связан с недостаточностью глюкокортикоидов и

минералокортикоидов. При этом нарушается конкурентная ингибция кортизолом АКТГ, который синтезируется в передней доле гипофиза и контролируется гипоталамическим кортикотропин-рилизинг-гормоном, который также служит объектом конкурентной ингибции кортизолом. При сольтерющей форме АГС продукция кортизола практически не происходит. При отсутствии кортизола АКТГ непрерывно стимулирует синтез цитохромов P₄₅₀, вовлеченных в синтез кортизола, что ведет к увеличению продукции предшественников кортизола: 17-гидрооксипрогестерона и прогестерона*, а также 17-гидрооксипрегненолона и продукта альтернативного пути метаболизма 17-гидроксипрогестерона - 21-деоксикортизола. При этом 17-гидрооксипрогестерон вызывает выведение ионов натрия и задержку ионов калия, что сопровождается потерей воды и изменением состава электролитов.

Для компенсации гиповолемии увеличивается поступление в кровь ангиотензина (вырабатывается в печени) и включается ренин-ангиотензин-альдостероновая система, регулирующая биосинтез минералокортикоидов. При этом юкстагломерулярные клетки почек освобождают ренин, который расщепляет ангиотензин с образованием мягкого сосудосуживающего ангиотензина I.

После этого ангиотензин-конвертирующий фермент (которым, например, богаты эндотелиальные клетки сосудов легких) отщепляет С-терминальный дипептид от ангиотензина I, продуцируя ангиотензин II, обладающий более сильным сосудосуживающим действием и стимулирующий секрецию альдостерона корой надпочечников.

Гиперсекреция АКТГ сопровождается повышенным выбросом в кровь меланоцитстимулирующего гормона, что ведет к гиперпигментации наружных гениталий.

* При простой вирилизирующей форме АГС оба эти предшественника накапливаются и метаболизируются через шунт биосинтетического пути андрогенов.

Кроме того, через метаболический путь биосинтеза половых гормонов стимулируется синтез андрогенных предшественников и тестостерона, не требующий 21-гидроксилирования.

Простая вирилизирующая форма АГС сопровождается только избыточной секрецией андрогенов: андростендиона, дигидроэпиандростерона и его сульфатированного конъюгата, синтезируемого в печени и коре надпочечников. При этом андростендион под действием 17-кетостероидредуктазы обратимо превращается в тестостерон, что определяет андрогенный эффект, а именно внутриутробную вирилизацию девочек с женским кариотипом между 6-10 нед беременности и постнатальную вирилизацию обоих полов.

У плодов мужского пола тестикулярные андрогены обеспечивают нормальную маскулинизацию, но их гиперпродукция в младенческом и раннем детском возрасте создает анаболические условия для преждевременного созревания костной ткани. У плодов женского пола гиперсекреция андрогенов тормозит формирование гипоталамогипофизарной системы, участвующей в регуляции метаболизма половых гормонов.

Лечение АГС: флудрокортизон в дозе 0,05-0,2 мг/сут плюс добавление в пищу поваренной соли или хлорида натрия до 2 г/сут. По показаниям проводятся реанимационные мероприятия с целью коррекции водно-электролитных нарушений.

Корректируют рост и «сомнительные» гениталии глюкокортикоидами, гидрокортизоном (в АКТГ-подавляющих дозах), преднизолоном, а также хирургическим путем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для онтогенеза эндокринной и экзокринной систем особое значение имеют общие с нейроонтогенезом молекулярно-генетические механизмы, обеспечивающие регуляцию экспрессии генов, контролирующую работу нейросекреторных клеток головного мозга и клеток периферических эндокринных желез, а также регулирующих нейроэндокринное влияние на соответствующие гены и их комплексы.

Механизмы регуляции экспрессии генов указывают на прямую и обратную нейроэндокринную связь, соответствующую текущим потребностям организма, условиям окружающей среды и индивидуальному отражению (запечатлению) действия факторов среды в коре больших полушарий мозга. Свидетельством такой связи служат

генетически детерминированные формы поведения человека, зависящие от уровня возбуждения ЦНС (страх, испуг, оборона, бегство, погоня и др.).

Кроме того, показана тесная корреляционная связь между экспрессией генов (содержанием мРНК) в нейронах, синтезом гормонов и уровнем метаболизма в клетках эндокринных и экзокринных желез при возбуждении и торможении нервной системы. Соответствующими примерами служат: сенсорная стимуляция, обучение, длительная тренировка, физическое напряжение и другие воздействия на ЦНС, повышающие ее возбудимость и увеличивающие экспрессию генов в нервной ткани и синтез гормонов в эндокринных и экзокринных железах. Иными словами, нервное возбуждение влияет на активность генов и всего генотипа, и его медиаторами являются специфические индукторы генной активности, или гормоны. В качестве одного из заключительных примеров рассмотрим эмоциональный стресс. В общем виде эта реакция приводит к ускоренному привлечению энергетических ресурсов организма при внезапно возникших (кризисных для него) ситуациях, требующих быстрой адаптации. Стрессовый сигнал поступает из анализаторных отделов мозга в гипоталамус, от него идет в гипофиз, который мгновенно реагирует выбросом в кровь собственных гормонов. Далее идут разные молекулярные пути (эндокринные оси), зависящие от внезапности и мощности воздействия факторов среды, обуславливающие быструю (или медленную) стимуляцию генной активности (через гормоны щитовидной железы, гормоны надпочечников и СТГ) в клетках и тканях рабочих органов и вызывающие адекватные ответные реакции.

Проведенные в последние годы молекулярно-генетические исследования свидетельствуют, что действие гормонов человека ведет к изменениям генной экспрессии в его нейронах, в которых нарушается частота рекомбинаций, экспрессивность и пенетрантность генов, наблюдается индукция доминантных аллелей генов, т.е. активность генома нервной системы существенно возрастает, и, что особенно важно, эти изменения наследуются.

Таким образом, между активностью мозговой ткани и активностью экспрессирующихся в ней генов существует прямая и обратная связь, и ключевая роль здесь принадлежит стрессовым механизмам регуляции наследственной изменчивости.

В целом эмоциональный стресс модифицирует (интегрирует) генный, биохимический, биофизический, гормональный, метаболиче-

ский, нервный и психический уровни функционирования организма, и наблюдаемая при этом генетическая и биохимическая изменчивость структур и функций головного мозга влияет на индивидуальную изменчивость психического состояния и поведения человека. Следовательно, молекулярно-генетические причины и механизмы различий в индивидуальной психике человека заключаются в особенностях строения и

функционирования его генотипа. Например, люди с наследственно обусловленным снижением уровня моноаминоксидазы (МАО), эндофинов и половых гормонов склонны к рисковому поведению, т.е. у них можно обнаружить генетически обусловленные индивидуальные психологические особенности. Данное научное направление получило название - биохимия мозга. Эта наука изучает общие закономерности метаболизма, происходящие в ЦНС и эндокринной системе. Несомненно, что биохимии (протеомике) мозга как науке принадлежит ближайшее будущее.

ГЛАВА 15 ОНТОГЕНЕЗ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО НАРУШЕНИЯ

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

К понятию «иммунитет» (защита) относятся реакции организма, нейтрализующие все чужеродное, что в него проникает через слизистые оболочки органов дыхания, зрения, желудочно-кишечного тракта или через органы слуха, кожу (включая инъекционный путь).

К чужеродным агентам и веществам относятся бактерии, микроорганизмы, вирусы, вакцины, сыворотки, поврежденные клетки собственного организма, лекарственные препараты, химические и другие соединения. Эти вещества называются антигенами.

Молекула антигена состоит из двух частей: *носитель* или стабилизирующая часть (занимает 97-99% всей массы), и *эпитоп* (специфическая детерминантная группа). На одном носителе может быть несколько эпитопов. По специфичности детерминантных групп выделяют видовые, групповые, стадийные, типовые и штаммоспецифичные антигены.

По чужеродности антигены делятся на ксеноили гетероантигены (не принадлежат к данному виду), гомоили аллоантигены (принадлежат к данному виду) и аутоантигены (собственные антигены).

В ответ на проникновение антигенов в организме происходят иммунные реакции, в ходе которых в крови и тканевой жидкости продуцируются антитела (крупные гликопротеины), способные к образованию иммунных комплексов «антиген-антитело». Вещества, не способные к образованию этих комплексов, называются гаптенами.

Таким образом, иммунный ответ - это защитная система организма, избавляющая его от генетически чуждых веществ и соединений. Она представлена лимфоидными органами и клетками. Среди лимфоидных органов выделяют:

- первичные органы - тимус и костный мозг (их развитие не стимулируется антигенами);
- вторичные органы - лимфатические узлы, селезенка, лимфоидная ткань слизистых оболочек (их развитие стимулируется антигенами).

Все лимфоидные органы тесно связаны со всеми тканями, органами и системами организма при помощи сетей кровеносных и лимфатических сосудов и капилляров, нервных волокон и окончаний.

Морфофункциональным субстратом иммунной системы являются иммунокомпетентные клетки, постоянно взаимодействующие друг с другом в ходе иммунного ответа. В первую очередь это лимфоциты, относящиеся к самой большой популяции клеток, отвечающей за специфическое распознавание, разрушение и элиминацию антигенов. Лимфоциты

отличают «свое» от «чужого», сохраняют об этом память, осуществляют синтез антител и цитотоксические реакции. Среди них выделяют:

- В-клетки - синтезируют антитела или поверхностные рецепторы, специфичные к определенным антигенам.
- Т-клетки - включают три субпопуляции клеток с различными функциями.
 - *первая субпопуляция* - взаимодействует с В-клетками, помогая им размножаться, созревать и образовывать антитела - это хелперные клетки (Тх) или помощники;
 - *вторая субпопуляция* - взаимодействует с мононуклеарными фагоцитами, способствуя разрушению находящихся в них микробов, - это также хелперные Т-клетки;
 - *третья субпопуляция* - разрушает клетки организма, зараженные вирусами, и опухолевые клетки - это цитотоксические клетки (Тц) или натуральные (естественные) киллеры (NK-клетки); они действуют при отсутствии антител (без предварительной иммунизации); к этой субпопуляции также относятся К-клетки, разрушающие клетки-мишени, содержащие на поверхности малое количество JgG.
- Большие гранулярные лимфоциты - совместно с Т-клетками и мононуклеарными фагоцитами участвуют в образовании медиаторов иммунных реакций или цитокинов.

Среди других клеток-участниц иммунного ответа выделяют следующие.

- Макрофаги и их предшественники - моноциты. К ним относятся мононуклеарные фагоциты системы комплемента и полиморфноядерные нейтрофилы. Они обеспечивают фагоцитоз и представление антигенов лимфоцитам, продуцируют цитокины (простагландины, интерлейкины, факторы комплемента).
- Вспомогательные клетки (тучные клетки, тромбоциты и базофилы). Они участвуют в реакциях воспаления и анафилактических реакциях.
- Другие клетки. Среди них: тканевые клетки (посылают сигналы лимфоцитам, отвечают на действие цитокинов, выделяемых Т-клетками и макрофагами, а также продуцируют интерфероны), клетки печени (производят вместе с макрофагами белки и факторы комплемента).

Все указанные клетки продуцируют ряд медиаторов, среди которых:

- *специфические медиаторы* - антитела или иммуноглобулины основных классов: А, D, Е, G и М, а также антигенраспознающие рецепторы В-клеток и Т-клеток;
- *антигенспецифические медиаторы*; продуцируются Т-клетками, усиливают или угнетают факторы иммунного ответа;
- *неспецифические медиаторы*; среди них лимфокины, монокины, ФНО и факторы торможения миграции макрофагов, медиаторы гиперчувствительности немедленного типа (гистамин, серотонин, фактор активации тромбоцитов), лизоцим и факторы системы комплемента.

Плазма крови поступает в различные ткани организма (их не менее 264 типов) из сосудистых капилляров, образуя межклеточную (тканевую) жидкость, омывающую все клетки. При этом она отдает клеткам питательные вещества и забирает от них продукты жизнедеятельности, после чего тканевая жидкость поступает через венозные и

лимфатические капилляры сначала в мелкие, а затем в более крупные лимфатические сосуды, открывающиеся в грудной проток и две подключичные вены.

Происхождение клеток иммунной системы показано на рис. 53. В частности, тромбоциты продуцируются мегакариоцитами. Гранулоциты и моноциты мигрируют из кровотока в ткани. Тучные клетки присутствуют во всех тканях. В-клетки созревают в печени плода и костном мозге, а Т-клетки - в тимусе. Большие гранулярные лимфоциты производятся в костном мозге, они обладают активностью нормальных киллеров (НК). Лимфоциты мигрируют из кровотока, проходят через вторичные лимфоидные ткани и снова поступают в кровоток.

Роль антигенпрезентирующих клеток во вторичных лимфоидных тканях выполняют интердигитарные и дендритные клетки. В разных местах организма лимфатические сосуды образуют узлы, где концентрируются лимфоциты. Эти узлы «отслеживают» (фильтруют) лимфатическую жидкость, в которой циркулируют лимфоциты, вступающие в прямые контакты с антигенами. При этом 1-2% лимфоцитов не остаются в лимфатических узлах, а снова перемещаются по кровеносным и лимфатическим сосудам из одного органа к другому, т.е. рециркулируют, что позволяет им находиться в постоянном контакте с соответствующими антигенами.

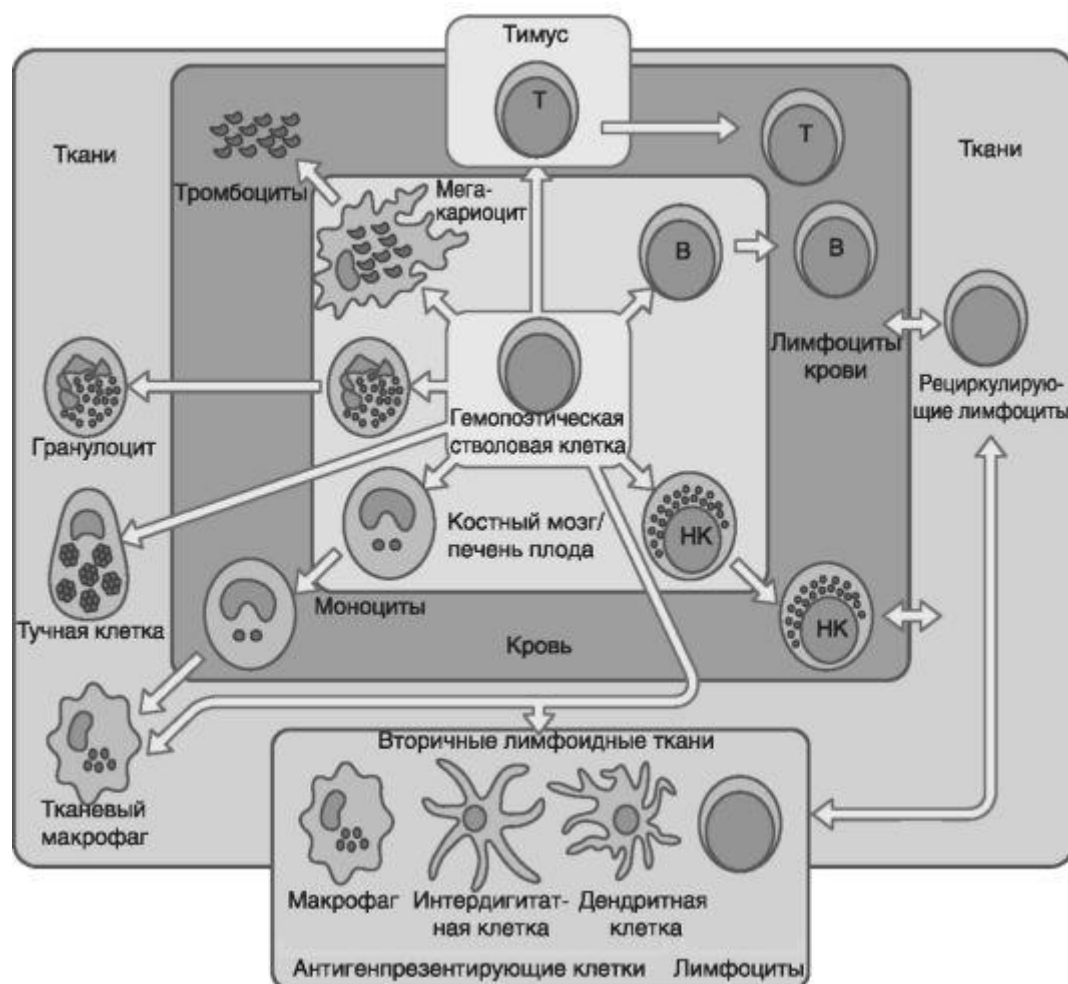


Рис. 53. Происхождение клеток иммунной системы (по Ройту А. и соавт., 2000). Все изображенные на рисунке клетки происходят от гемопозитической стволовой клетки

В случае повторной иммунизации одним и тем же антигеном рециркуляция останавливается приблизительно на 24 ч, что объясняется избирательной задержкой

антигенспецифичных лимфоцитов в лимфоузлах, «дренирующих» место проникновения антигена. Лимфоидная ткань слизистых оболочек содержит 40% всех лимфоцитов, селезенка - 30%, лимфатические узлы - 20%, кровеносные и лимфатические сосуды - по 5%.

Единство иммунной, эндокринной и нервной систем

Иммунная система функционирует в тесном взаимодействии с нервной и эндокринной системами. Совместно эти главные регуляторные и защитные системы обеспечивают приспособляемость организма к окружающей среде. Получено много доказательств такого взаимодействия. Например, на клетках иммунной системы выделены рецепторы к гормонам (кортикостероидам, инсулину, СТГ, тестостерону) и другим биологически активным веществам - ацетилхолину, бета-адренергическим медиаторам, эндофинам, энкефалинам, эстрадиолу.

Ряд гормонов (глюкокортикоиды, андрогены, эстрогены и прогестерон) подавляют иммунные реакции, в то время как другие гормоны (инсулин, тироксин и СТГ) наоборот их стимулируют. Интерлейкины (их не менее 18) выполняют функции медиаторов ЦНС. Так, ИЛ-2 продуцируется клетками нервной ткани и влияет на пролиферацию олигодендроцитов. В последние годы показано, что иммунитет контролируется гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системой. Например, при изучении влияния нейрорезонансного стресса на активность иммунитета у спортсменов-профессионалов оказалось, что такой стресс индуцирует у них транзиторный иммунодефицит, в ходе которого снижается активность NK-клеток, уменьшается соотношение показателей маркеров CD4/CD8 и содержание IgA, замедляется пролиферация лимфоцитов в ответ на действие антигенов и митогенов. Получены также доказательства связей активации локальных иммунных реакций (увеличение лейкоцитарной инфильтрации эндометрия, количества Т-клеток, NK-клеток, макрофагов, рост титров иммуноглобулинов М, Аи G) с обуславливающими прерывание беременности нарушениями следующих процессов: имплантации зародыша в стенку матки; инвазии; развития хориона.

ОНТОГЕНЕЗ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ

Иммунная система начинает формироваться на 4-й неделе онтогенеза.

Первичные лимфоидные органы

Тимус

Тимус (вилочковая железа) - это инфильтрированный лимфоцитами орган, секретирующий ряд пептидных гормонов, участвующих в дифференцировке лимфоидных органов и клеток (см. главу 14). Из них хорошо изучены тималин, альфа- и бетатимозин и тимопоэтин. Тимус развивается раньше других лимфоидных органов из зачатков III и IV пар жаберных карманов головного конца кишечной трубки. Начиная с 5 нед в тимусе секретируются предшественники Т-клеток и хемотаксические факторы, привлекающие протимоциты костного мозга (будущие лимфоциты). Лимфатические сосуды тимуса представлены густой капиллярной сетью, начинающейся в междольковых септах соединительной ткани, в которых концентрируются и окончательно созревают Т-клетки. На 6-7 нед беременности в тимусе начинается дифференцировка на мозговую и корковую зоны, он смещается за грудину и вокруг образуется капсула. В 7-16 нед дифференцируются секреторные клетки - это критический период развития, во время которого корковая зона инфильтрирована малыми лимфоцитами, нейтрофилами, эозинофилами и тучными клетками. Здесь же находятся гемоцитобласты (источники будущих лимфоцитов) и отдельные очаги экстрамедуллярного лимфопоэза. Мозговая зона

содержит небольшое количество лимфоцитов, многоядерных клеток слияния, крупных светлых клеток и макрофагов (способных к фагоцитозу). В конце дифференцировки в тимусе содержатся 84% Т-клеток и 1% В-клеток, что соответствует клеточному составу железы взрослого человека.

По мере созревания привлеченных из костного мозга протимоцитов на их поверхности начинают экспрессироваться антигены, включая маркер CD1 (специфичен для незрелых Т-клеток) и маркеры CD3, CD4, CD5 и CD8 (специфичны для Т-хелперов и Т-киллеров).

Зрелые тимоциты экспрессируют маркер CD44, который служит рецептором для компонентов внеклеточного матрикса и выявляется на всех циркулирующих лимфоцитах.

Максимальное развитие тимуса отмечается в детском возрасте, когда наблюдается быстрый рост тела. После полового созревания развитие железы замедляется и начинается ее инволюция, которая продолжается до конца жизни. Примерно к 25-летнему возрасту прекращается рост тела человека (чему способствует эффект СТГ) и нарушается ранее стабильное соотношение Т- и В-клеток. После 40 лет продукция гормонов тимуса снижается на 50%.

Костный мозг

Костный мозг как кроветворный орган развивается, начиная с 16-18 нед. До этого срока кроветворную функцию выполняет печень. В первой половине жизни в костном мозге выявляются 16-18% В-клеток и 1,5-1,8% Т-клеток. В дальнейшем их количество постепенно снижается параллельно с инволюцией тимуса. Лимфоциты образуются в костном мозге в течение всей жизни из полипотентных стволовых клеток.

Вторичные лимфоидные органы

Селезенка

Селезенка развивается из мезенхимы дорсальной брыжейки будущего большого сальника. На 4 нед развития она представлена скоплением клеток на стенке желудка, а на 5 нед в этом скоплении определяются единичные бласты, макрофаги и ретикулярные волокна. На 13 нед это уже отдельный полый орган, готовый для депонирования крови. В нем видны ретикулярная ткань, трабекулярный остов и сеть кровеносных сосудов.

На 14 нед в селезенке появляются фолликулы (без лимфоцитов) и слабо определяется гемопоэтическая функция. На 15 нед селезенка «заселяется» лимфоцитами: В-клетки составляют 13%, Т-клетки - 2,5% (до этого времени В-клетки определяются только в печени).

На 16-20 нед в селезенке уже 30% В-клеток и 16% Т-клеток, и такое соотношение сохраняется до рождения ребенка.

У взрослого человека в селезенке преобладает антителообразование. К другим ее функциям относится участие в системе неспецифической резистентности, которую обеспечивают поступившие в селезенку прелимфоциты, преобразующиеся в НК-клетки.

Лимфатические узлы

Лимфатические узлы имеют фолликулы, синусы и строму. Их функция заключается в «вылавливании» антигенов из лимфы. Они

расположены в местах разветвления лимфатических сосудов, находящихся в «стратегических» пунктах лимфоидной системы: шейной, подмышечной и паховой

областях, средостении и брюшной полости. В них собирается лимфа из глубоких и поверхностных областей тела.

Если лимфоузлы расположены поверхностно, их называют подкожными (защищают кожу), если глубоко, то это висцеральные узлы (защищают слизистые оболочки органов дыхания, пищеварительного тракта и мочеполовых путей).

Лимфатические узлы развиваются в разное время. В одних случаях они развиваются на 6-7 нед беременности (шейные узлы, узлы перитонеальной и паховой областей). В других случаях они развиваются поздно - это мезентериальные узлы. На первом году жизни определяются затылочные узлы, после трех лет - подчелюстные узлы.

Окончательно все лимфатические узлы формируются к 10 годам жизни, и их количество у взрослого человека достигает 500, а общая масса соответствует 1% массы тела.

В возрасте 16-50 лет функция всех лимфатических узлов относительно стабильна, а после 60 лет в них уменьшается число лимфоцитов.

Лимфоидная ткань слизистых оболочек

Лимфоидная ткань слизистых оболочек (ЛТС) - это скопления лимфоцитов, фагоцитов и плазматических клеток, находящихся в бескапсулярных субэпителиальных фолликулах. Она расположена под слизистыми оболочками в легких, глоточном кольце Вальдейера-Пирогова (включает язычную, небную и глоточную миндалины), пейеровых бляшках (нижняя часть подвздошной кишки) и аппендиксе (отросток слепой кишки).

Глоточное кольцо развивается (как и тимус) из головного отдела кишечной трубки.

У детей 3-7 лет глоточные миндалины наиболее развиты, с 12 лет начинается их инволюция и уже к 16 годам обнаруживаются только остатки миндалин.

Лимфоциты ЛТС представлены Т-клетками, многие из которых являются клетками памяти (имеют маркер CD45RO). Они преимущественно синтезируют иммуноглобулины JgA и JgE (плазматические клетки в основном производят JgA), слабо реагируют на антигена к маркеру CD3, но чувствительны к антигенам к маркеру CD28.

ЛТС отличается от других лимфоидных органов еще и тем, что циркулирующие в организме лимфоциты возвращаются главным образом в нее, что объясняется экспрессией клетками этой ткани «молекул возврата домой», связывающихся с молекулами адгезии или адресинами, находящимися на поверхности эндотелиоцитов, а также пейеровых бляшек.

Аппендикс

Первые скопления лимфоидной ткани в аппендиксе (и тонкой кишке) определяются на 3 мес развития. С 4 мес появляются групповые фолликулы, количество и масса которых постепенно нарастает. С 17 нед в нем определяются В- и Т-клетки. В первые дни жизни в фолликулах аппендикса появляются скопления лимфобластов. До 22 лет их масса медленно увеличивается, а в 28 лет - уменьшается, и к 40 годам наступает атрофия фолликулов (у стариков - облитерация отростка).

Печень

Печень закладывается на 4 нед и уже с 5 нед является центром кроветворения, в котором определяется небольшое количество Т-клеток. С 9-10 нед из стволовых клеток, находящихся в островках гемопоэтической ткани, появляются В-клетки. На 12-14 нед их

максимум достигает 15%. На 16-18 нед печень прекращает свою кроветворную функцию, передавая ее к функционально активному в это время костному мозгу.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Общая характеристика и гены иммунного ответа

Иммунный ответ организма на действие антигенов - это генетически детерминированный процесс, в котором принимают участие лимфоидные органы и клетки, имеющие сложную систему организации, включающую клеточные рецепторы, иммуноглобулины, медиаторы и другие компоненты.

Иммунный ответ имеет две фазы: *ранняя* - распознавание антигена специфическими лимфоцитами и их активация, и *поздняя* (эффektorная) - координация механизмов устранения чужеродных веществ. Каждый из участников иммунного ответа контролируется одним или несколькими генами, а вся иммунная реакция - это

результат работы множества генов (целая генная сеть), ответственных за сохранение генетического и белкового (антигенного) постоянства организма. В настоящее время в основном завершено изучение генов, контролирующих развитие и функционирование иммунитета. Систему иммунитета у человека контролирует генная сеть, включающая 2190 генов, состоящих из 166 миллионов нуклеотидов ДНК или 6% всех генов генотипа.

Основная часть этих генов локализована на хромосоме 6. Из общего числа генов 633 гена находятся в неактивном состоянии, т.е. кодируемые ими белки не экспрессируются (не транскрибируются). Функции оставшихся 1557 генов изучены примерно у половины, в том числе показана роль 130 генов в развитии нарушений иммунитета (см. ниже). Обычно иммунные реакции в организме протекают скрытно и почти незаметно приводят к полному разрушению антигенного агрессора или частичному подавлению его патогенного действия.

Иммунный ответ включает ряд основных событий. Среди них:

- переработка и представление антигена в иммуногенной форме;
- кооперация Т- и В-клеток в распознавании антигена;
- внутриклеточный синтез антител (антигенраспознающих рецепторов);
- переключение синтеза одного класса иммуноглобулинов на другой.

В результате этих событий в ходе иммунного ответа в организме происходит нейтрализация и уничтожение чужеродных антигенов. Первая встреча с антигеном характеризуется ранней продукцией антител IgM-класса, и позднее появляются антитела IgG-класса.

Первый иммунный ответ связан с тремя фазами накопления антител:

- *латентная фаза* - время между проникновением антигена и появлением в сыворотке первых антител;
- *фаза роста* - быстрое увеличение концентрации антител до максимальных величин;
- *заключительная фаза* - снижение концентрации антител (вплоть до полного их исчезновения) с сохранением небольшого числа «клеток памяти».

Продолжительность этих фаз зависит от числа лимфоцитов и стадии их дифференцировки, структурных особенностей, дозы, способа и места проникновения антигена, а также индивидуальных особенностей организма.

При повторной иммунизации антитела, образовавшиеся за счет «клеток памяти» при первой иммунизации, накапливаются быстрее и в значительно большем количестве. Повторный контакт с тем же антигеном приводит к преимущественному накоплению IgG-антител.

Межклеточная кооперация

Для полноценной продукции антител в ходе иммунного ответа необходима межклеточная кооперация по крайней мере двух типов клеток: Т- и В-лимфоцитов, так как одна В-клетка не может реализовать свой потенциал, пока не получит помощь со стороны Т-хелперов.

Выделены три участника процесса антителообразования: В-клетки, Т-клетки и макрофаги. Функция каждого из них в гуморальном иммунном ответе предопределена.

В упрощенной форме межклеточные отношения можно представить следующим образом:

- проникший в организм антиген захватывается макрофагом;
- после внутриклеточной переработки фрагменты антигена выводятся на клеточную поверхность макрофага в иммуногенной форме (доступной для В- и Т-клеток);
- В-клетки с помощью своих антигенраспознающих рецепторов (поверхностных IgM) узнают антиген и тем самым подготавливают себя к продукции антител;
- Т-хелперы (одна из субпопуляций Т-клеток) также распознают этот антиген и становятся способными к оказанию помощи В-клеткам для их полноценного развития и функционирования.

Межклеточная кооперация также необходима для формирования клеточного иммунного ответа на трансплантат. В этом случае в ближайшем к месту трансплантации лимфатическом узле наблюдается взаимодействие предшественника Т-киллеров с Т-хелперами и макрофагами и взаимодействие В-лимфоцита с Т-хелперами и макрофагами.

Реакция трансплантационного иммунитета включает три этапа:

- распознавание антигенов трансплантата;
- созревание и накопление эффекторов реакции трансплантации в ближайшей к трансплантату периферической лимфоидной ткани;
- разрушение трансплантата.

Системы иммунного ответа

Несколько условно иммунный ответ организма на действие чужеродных веществ и контроль за уничтожением собственных (поврежденных) клеток делят между собой на четыре системы: неспецифическая резистентность, врожденный иммунитет, приобретенный иммунитет и иммунологическая толерантность.

Неспецифическая резистентность

Неспецифическая резистентность - это защитные реакции, обуславливающие невосприимчивость организма к инфекциям. Они зависят от целостности и

функциональной активности кожи и слизистых оболочек, а также интенсивности клеточного фагоцитоза, но не зависят от специфичности чужеродных агентов.

В этой защите главная роль принадлежит макрофагам: мононуклеарным моноцитам и нейтрофилам (эозинофилам и базофилам). Эти клетки способны переходить из одной формы в другую.

Кроме участия в фагоцитозе, мононуклеарные моноциты выполняют функции клеток, презентующих (представляющих) антиген для узнавания лимфоцитами.

К клеткам неспецифической резистентности также относятся прелимфоциты (будущие НК-клетки), дифференцировка которых завершается в селезенке.

Врожденный иммунитет

Врожденный иммунитет - филогенетически наиболее древняя защитная система организма, оберегающая его от разных патогенов (вирусы, бактерии, грибы). Эта система особенно важна для раннего развития, когда механизмы адаптивного иммунитета еще не развиты.

Согласно современным представлениям, распознающими рецепторами при врожденном иммунитете являются эволюционно консервативные Toll-подобные (like) рецепторы или TLR, которые не меняют своего функционального назначения в ходе онтогенеза (всегда стабильны), контролируются генами раннего развития и передаются из поколения в поколение через клетки зародышевой линии (см. ниже).

TLR были открыты у млекопитающих в конце 90-х годов XX в. Эти рецепторы экспрессируются моноцитами, макрофагами, НК-клетками, незрелыми дендритными клетками, клетками эпителия и эндотелия. Они иницируют врожденный иммунитет, распознавая паттерны (образцы) молекул патогенов, отсутствующие у человека.

Ранее считалось, что ключевую роль во врожденном иммунитете играет система комплемента, о которой в последние годы говорят все меньше и меньше. Однако старое название по-прежнему актуально.

В систему комплемента входят около 30 белков плазмы крови, из которых 9 - это собственно белки комплемента (C1-C9), а остальные - это его факторы (B, D, P, H и др.).

Некоторые белки комплемента являются проферментами и активизируются только после диссоциации на отдельные фрагменты.

Многие белки комплемента представляют собой «мозаику» из продуктов экзонов, относящихся к генам разных суперсемейств. Например, Os - фермент классического пути - имеет участки аминокислотной последовательности, состоящей из сериновой эстеразы и рецептора для липопротеинов низкой плотности, а также короткий общий повтор, встречающийся в суперсемействе регуляторных белков комплемента. Сходным образом устроены белки C6-C9, относящиеся к лизирующему мембрану комплексу, имеющему общие свойства с перфорином цитотоксических Т-лимфоцитов и катионным белком эозинофилов.

Белки комплемента способны отличать «свое» от «чужого». Эта способность в нормальном организме обеспечивается за счет регуляторных молекул, находящихся на поверхности собственных клеток и подавляющих активацию комплемента.

Активация белков комплемента происходит по классическому и альтернативному пути. В нормальном состоянии поверхностные регуляторные молекулы клеток и тканей организма блокируют действие основного белка - C3, что подавляет активацию других белков комплемента. В случае проникновения в организм чужеродных структур, лишенных регуляторных белков, начинается активация молекулы белка C3a. Например, такая активация происходит при попадании в ткани и кровь (либо образовании в них) разных активаторов (грамположительные и грамотрицательные бактерии, вирусы, микроорганизмы, иммунные комплексы). С началом активации происходит каскадное взаимодействие белков комплемента и образование промежуточных продуктов, повреждающих мембраны чужеродных клеткамишеней. При классической активации происходит связывание чужеродных иммунных комплексов с белком C3, что объединяет

приобретенный иммунитет (образование антител) с врожденным иммунитетом (система комплемента).

В плазме крови постоянно происходит «холостая» активация C3, приводящая к фиксации небольшого числа его молекул на поверхности как «своего», так и «чужого». Активаторами альтернативного пути служат компоненты микроорганизмов. Участниками этого пути являются факторы В, D и др. Основные события происходят после расщепления белка C3. При этом формируется мембрано-атакующий комплекс (МАК), состоящий из белков C5-C9. Кульминацией событий является присоединение молекулы C9 к мембране клеткамишени и последующее изменение конформации адсорбированного на ней макромолекулярного комплекса с образованием воронкообразного отверстия, после чего наступает лизис клетки. В результате работы белков комплемента появляются анафилотоксины (освобождают гистамин из базофилов и тучных клеток), хемотаксины (вызывают миграцию клеток в место работы комплемента) и модуляторы иммунного ответа (C3a подавляет, а C5a усиливает продукцию антител). В случае затяжного инфекционного процесса в организме образуется стабильный иммунный комплекс «агент-антитело», который становится активатором комплемента по классическому пути.

К основным событиям в ходе активации комплемента относятся:

- опсонизация микробов для их поглощения фагоцитами;
- непосредственное уничтожение микробов путем лизиса;
- активация и хемотаксическое привлечение лейкоцитов в очаг воспаления;
- процессинг (расщепление) иммунных комплексов;
- индукция специфических антител.

Для фагоцитирования чужеродной частицы, как правило, требуется ее связывание с белковыми компонентами C3b и iC3b. Некоторые вирусы после взаимодействия с антителом могут нейтрализоваться только с помощью компонентов C1 и C4. Для инактивации других вирусов требуется участие компонентов C2 и C3.

Иммунное прилипание, заключающееся в соединении иммунного комплекса с рецептором комплемента 1 (CR1), происходит при активации белков комплемента на этапе от молекулы C4 до молекулы

C3.

Высвобождение гистамина из тучных клеток, сокращение гладких мышечных волокон и усиление сосудистой проницаемости, вызванные активностью анафилотоксина, являются свойствами каждого из

двух фрагментов (C3a и C5a), высвобождающихся при расщеплении конвертазами молекул C3 и C5. Эти фрагменты также являются хемотаксическими факторами для полиморфно-ядерных лейкоцитов. Хемотаксические свойства особенно выражены у фрагмента C5a, вызывающего экзоцитоз нейтрофилов.

Следовательно, основными функциями системы комплемента являются: лизис клеток; растворение иммунных комплексов; участие в фагоцитозе и воспалительной реакции; образование хемотаксинов; модуляция иммунного ответа и нейтрализация веществ.

Приобретенный иммунитет

Приобретенный или адаптивный иммунитет - это система адаптации организма в ответ на действие чужеродных веществ, когда система врожденного иммунитета по тем или иным причинам с ними не справляется. Эта система сформировалась в ходе эволюции в результате перегруппировки генов иммуноглобулинов в костном мозге и упорядочения Т-клеточного иммунитета в тимусе человека.

Известно, что в случаях, когда организм инфицируется микроорганизмами, основная нагрузка падает на В-лимфоциты. Результатом их работы является синтез и накопление специфических антител, которые нейтрализуют эти микроорганизмы и их токсины.

Если же организм столкнулся с вирусной инфекцией, то в работу вступают субпопуляции Т-лимфоцитов и находящиеся на их поверхности антигенраспознающие или Т-клеточные рецепторы (ТКР), а также большая группа (около 100) регуляторных молекул - цитокинов. Иными словами, формируется многообразие распознающих элементов клетки, перекрывающее весь спектр существующих в природе антигенов. Одна из клеточных субпопуляций - Т-киллеры (цитотоксические Т-клетки) - является основным участником антивирусного иммунитета.

Иммунной системой как «свои» определяются эпитопы антигенов собственных клеток и тканей, закодированных в молекуле ДНК, тогда как все другие эпитопы определяются как «чужие». В первом случае комплексы «антиген-антитело» не образуются, так как этому препятствуют механизмы иммунологической толерантности.

Вместе с тем, иммунная система может неадекватно отреагировать на аутоантигены, т.е. образовать с ними такие комплексы, которые приведут к тяжелым последствиям для организма.

Иммунологическая толерантность

В ходе иммунного ответа в организме производится огромное число антигенспецифичных антител (рецепторов), находящихся на поверхности клеток. При этом некоторые рецепторы могут вступать во взаимодействие с антигенами, находящимися на собственных клетках организма, и именно тогда наблюдается иммунологическая толерантность (невосприимчивость), предотвращающая нежелательное действие антител против собственных клеток и тканей. Указанная система иммунного ответа включает тимическую (центральную) и посттимическую невосприимчивость к аутоантигенам. В первом случае ее обеспечивают Т-клетки тимуса, обладающие низкой аффинностью (сродством) с аутоантигенами. Из них формируются Т-лимфоциты, которые не образуют с ними иммунных комплексов. Во втором случае выделяют три механизма:

- Циркулирующие в крови аутореактивные Т-клетки не замечают аутоантигены, локализованные в тканях, не связанных с их циркуляцией.

- Аутореактивные Т-клетки становятся анергичными за счет снижения экспрессии рецепторов, т.е. утрачивают способность взаимодействовать с аутоантигенами.
- Иммунное отклонение. Известны две популяции Т-лимфоцитов, продуцирующих разные цитокины. Одна из них поддерживает Тх2, другая подавляет Тх2 при воспалительной реакции и реакции гиперчувствительности замедленного типа, либо обе популяции препятствуют дифференцировке Тх0 в Тх2. Такое иммунное отклонение искусственно вызывается для предотвращения отторжения трансплантата, а также для лечения ряда аллергических и аутоиммунных болезней.

Главный комплекс гистосовместимости

Открытие закономерностей реакции отторжения клеток трансплантата от клеток организма хозяина было связано с открытием комплекса локализованных на лимфоцитах антигенов, получивших название HLA-системы (human leukocyte antigen - человеческий антиген лейкоцитов). В дальнейшем совокупность генов, контролирующих широкий спектр их активности, получила название генов главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) или Major Histocompatibility Complex (МНС). Известны 220 тесно сцепленных между собой генов ГКГ, локализованных на коротком плече хромосомы 6, где они зани-

мают 3500 кб. Все гены разделены на три класса, и их продуктами являются антигены также трех классов.

Название генов и антигенов состоит из букв (обозначают гены) и цифр (обозначают аллели этих генов), например А3, В45, DR15, DQ4. Цифры присваиваются по мере открытия новых аллелей.

Гены и антигены ГКГ обладают выраженным генетическим полиморфизмом. В первых публикациях по иммунологии совокупность генов и антигенов ГКГ ошибочно обозначалась как генотип и фенотип, хотя эти понятия классической генетики относятся исключительно к организму индивида, и такое их использование неверно. Поэтому лучше говорить о количестве генов (генных локусов), локализованных на коротком плече хромосомы 6, и количестве молекул антигенов, экспрессируемых этими генами на поверхности клеточных мембран. Распределение, структура и особенности генов и антигенов главного комплекса гистосовместимости

На рис. 54 приведено распределение генов и антигенов ГКГ. На коротком плече хромосомы 6 локализованы три класса генов (локусов) ГКГ.

- Локусы I класса (А, В и С). Они кодируют трансплантационные белки-гетеродимеры, состоящие из двух типов молекул: а) моле-

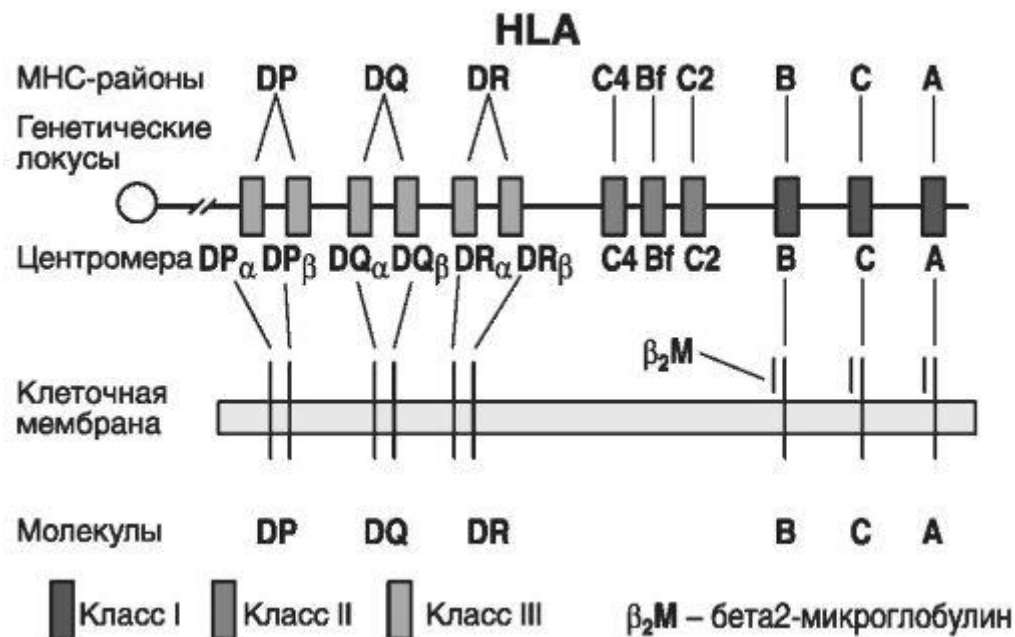


Рис. 54. Гены, их локусы и антигены ГКГ

кула легкой P₂-цепи микроглобулина (12 кДа), являющаяся продуктом гена, локализованного на хромосоме 15; б) молекула тяжелой α-цепи (44 кДа), являющаяся продуктом гена, локализованного на хромосоме 6. При этом антигены I класса (HLA-A, HLA-B и HLA-C) кодируются тремя отдельными парами генов, экспрессируются и выводятся на наружную поверхность клеточных мембран почти во всех клетках и тканях организма, кроме клеток нейроглии ворсинчатого трофобласта. Продукт четвертого D-локуса этого класса - антиген HLA-D (на рис. 54 он не обозначен) экспрессируется только в ворсинчатом трофобласте. Чаще всего антигены этого класса определяются на лимфоидных клетках, в меньшей степени - на клетках печени, легких, почек и редко встречаются на клетках мозга и мышц.

- Локусы II класса (DP, DQ и DR) или D-область, кодирующая α- и β-цепи молекул антигенов DP, DQ и DR. Молекулы этих антигенов также являются трансплантационными гетеродимерными белками, состоящими из легкой β-цепи (26 кДа) и тяжелой α-цепи (33 кДа). Эти белки экспрессируются на поверхности клеточных мембран. Распределение антигенов II класса более ограничено по сравнению с таковым антигенов I класса. Они ассоциированы с В-клетками и антигенпрезентирующими клетками (клетки Купфера), дендритными клетками, клетками альвеолярного эпителия, а также макрофагами. Например, их можно обнаружить при активации гамма-интерфероном эпителия капилляров. Некоторые различия между антигенами II класса объясняются тем, что альфа-цепь DQ-локуса инвариантна, и ее аллельное разнообразие обусловлено бета-цепью (бета1-доменом). В то же время в антигенах, кодируемых DP- и DQ-локусами, обнаружены аллельные формы легкой и тяжелой цепей, но и их основой является бета1-домен. Кроме того, у антигенов этого класса антигенсвязывающий центр формируется альфа1- и бета1-доменами, в то время как роль мембранных доменов сводится к усилению связывания антителопродуцирующих клеток.

- Локусы III класса (C4, Bf и C2). Все локусы этого класса находятся между локусами I и II классов. Они контролируют синтез белков комплемента 2, 4a и 4b и производство цитокинов: TNFα и TNFβ.

Структура антигенов I и II классов хорошо изучена. Например, определена аминокислотная последовательность десятков вариантов

этих молекул и пространственная конфигурация некоторых из них (HLA-A2). Оба этих класса антигенов относятся к суперсемейству иммуноглобулинов.

В отличие от основных классов иммуноглобулинов, где разнообразие молекул достигается за счет мультигенной системы, разнообразие антигенов этого суперсемейства обеспечивается полиморфной системой, базирующейся на множественности аллелей.

По состоянию на апрель 2002 г. в базе данных нуклеотидных последовательностей ДНК содержалась информация о 1528 аллелях ГКГ, в том числе:

- первый класс - 245 аллелей HLA-A, 480 аллелей HLA-B, 117 аллелей HLA-C, 6 аллелей HLA-E, 1 аллель HLA-F и 15 аллелей HLA-G;
- второй класс - 3 аллеля HLA-DRA, 380 аллелей HLA-DRB, 22 аллеля HLA-в DQA1, 52 аллеля HLA-DQB1, 20 аллелей HLA-DPA1, 97 аллелей HLA-DPB1, 4 аллеля HLA-DMB, 8 аллелей HLA-DOA и 8 аллелей HLA-DOB. Их типирование не завершено, и ежегодно открываются новые аллели.

Наследование генов ГКГ соответствует моногенному варианту, и гены наследуются кодоминантно двумя блоками - по одному от каждого родителя. Такой блок называется гаплотипом и обозначает совокупность аллелей одних и тех же генов (см. главу 3). От каждого родителя гаплотип передается потомку практически без рекомбинаций - их частота не превышает 1% (в материнской хромосоме 6 она несколько выше, чем в отцовской).

Таким образом, каждая клетка человека имеет 8 антигенов или 4 пары (A, B, C и D), и потомок двух родителей в 25% случаев имеет полное совпадение с родителями по 2 из 8 антигенов (сходство двух гаплотипов), в 50% случаев - сходство с родителями по одному гаплотипу (4 из 8 антигенов) и в 25% случаев - полное несоответствие гаплотипов.

Функции главного комплекса гистосовместимости и дифференцировка Т-лимфоцитов

ГКГ занимает центральное место в дифференцировке и окончательном созревании Т-лимфоцитов. Перед дифференцировкой пре-Тлимфоциты мигрируют из костного мозга в тимус, где на поверхности лимфоцитов начинается экспрессия двух маркеров (CD4 - маркер Т-хелперов и CD8 - маркер Т-киллеров). Однако у них еще нет антигенраспознающих Т-клеточных рецепторов (ТкР). Экспрессия

ТкР начинается с момента обучения Т-клеток, в ходе которого из множества попавших в тимус клеток дальнейшее развитие получают только те, чьи рецепторы способны взаимодействовать с антигенами ГКГ, обильно представленными в строме железы.

Селекция клонов Т-клеток - это основное событие в тимусе, связанное с отбором клеток по способности распознавать собственные антигены, что является определяющим условием дифференцировки. Все остальные клетки, не прошедшие контроль на специфичность, гибнут.

В тех случаях, когда распознаются антигены класса I, лимфоциты «выбирают» путь развития в сторону Т-киллеров (маркер CD8). Если распознавание связано с антигенами ГКГ класса II, то формируются Т-хелперы (маркер CD4). Причем узнавание «своего» осуществляется не всем антигенраспознающим центром ТкР, а лишь его частью. Оставшаяся часть центра будет взаимодействовать с возможными в будущем антигенами,

и только тогда принцип двойного распознавания «своего» или «чужого» найдет реальное проявление.

Таким образом, антигены ГКГ выступают как факторы селекции Т-клеток (определяют становление клонов, способных к узнаванию аутоантигенов) и как факторы дифференцировки (формируют субпопуляции клеток).

Показано, что антигены ГКГ вовлечены в дифференцировку эмбриональных клеток, а возможно, и клеток плаценты.

Антигены класса I входят в состав гормональных рецепторов. Например, связывание инсулина заметно снижается, если с поверхности клетки удалить эти антигены (но не антигены класса II).

Описаны ассоциации антигенов с рецепторами глюкагона, эпидермального фактора роста и гамма-эндорфина. Кроме того, антигены ГКГ участвуют в опосредованных гормонами неиммунологических реакциях, например в регуляции массы тела.

Иммуноглобулины

Все известные антитела представляют собой иммуноглобулины. У человека выделено 5 основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgG, IgD, IgE и IgM. Каждый из этих классов обладает своими биологическими свойствами, однако все они построены по общему плану.

Из всех классов иммуноглобулинов наиболее сложно организован IgM. Так, если IgG представляет собой одну субъединицу, то IgM - это уже 5 субъединиц.

Общее число иммуноглобулинов очень велико. Эта вариабельность обусловлена значительным набором V-генов (не менее 500 для V-области тяжелой цепи и не менее 100 для V-области легкой цепи) и только одним геном (или весьма ограниченным их числом) для константной области (C). Благодаря этому в процессе созревания В-лимфоцита рекомбинация генетического материала происходит так, что один из сотен V-генов образует единый информационный комплекс с C-геном в виде уникальной молекулы мРНК, что объясняет специфичность конкретных антител.

Хромосомная локализация генов иммуноглобулинов

Хромосомная локализация генов иммуноглобулинов дана в табл. 9.

Таблица 9. Хромосомная локализация генов иммуноглобулинов

Иммуноглобулины	Хромосомы
IgH (тяжелые цепи)	14, 15, 16
λ -цепь (лёгкие цепи)	22
κ -цепь (лёгкие цепи)	2
α -цепь ТкР	14
β -цепь ТкР	7
γ -цепь ТкР	7

δ-цепь ТкР	14
β ₂ -микроглобулин	15

Антигенраспознающие рецепторы

В настоящее время определены антигенраспознающие рецепторы В- и Т-лимфоцитов и причины их разнообразия. Множественность генов V-областей (H- и L-цепи иммуноглобулинов) - одна из таких причин. Еще четыре причины - множественный аллелизм генов, а именно:

- соматический мутагенез (создает разные V-гены);
- соматическая рекомбинация между сегментами одного V-гена (создают разные белки);
- генная конверсия (ведет к копированию отдельных частей гена);
- вставки добавочных нуклеотидов (кодируют остатки V-областей).

Секретируемые В-клетками иммуноглобулины представляют собой бифункциональные молекулы. Их V-домены предназначены для связывания с антигеном, тогда как C-домен взаимодействует с

рецепторами на клетках организма-хозяина или с факторами комплемента.

Что касается общей регуляции уровня антител в организме, то степень катаболизма иммуноглобулинов находится в прямой зависимости от их тотальной концентрации, тогда как синтез антител в основном регулируется с помощью антигенной стимуляции. Например, у животных, содержащихся в стерильных условиях, уровень IgG чрезвычайно низок, но он быстро повышается после возвращения животного в нормальные условия.

Распознавание антигенов В-клетками осуществляется за счет молекул мембраносвязанных иммуноглобулинов (mIg). При этом на поверхности каждого лимфоцита экспрессируются 10-100 тысяч молекул антител. Основными классами mIg, находящихся на поверхности зрелых и нестимулированных В-лимфоцитов, являются молекулы IgM и IgD. На одной В-клетке могут одновременно присутствовать обе эти молекулы. У них одинаковая специфичность, и они могут взаимодействовать между собой, осуществляя кооперативный контроль за активацией и супрессией лимфоцитов.

В ходе иммунного ответа одновременно экспрессируются другие классы иммуноглобулинов. Если рецептором В-клетки, узнающим антиген, является IgM, то мембраносвязанный IgM представляет собой, как правило, мономерный иммуноглобулин. Эта молекула имеет гидрофобную часть, расположенную на C-конце тяжелой цепи и предназначенную для фиксации молекулы на мембране. При этом mIgM кодируются тем же набором генов, что и их сывороточные аналоги.

Единственным структурным отличием является дополнительный фрагмент на C-конце, играющий роль мембранного якоря.

Цитоплазматический участок у mIg невелик и не пригоден для взаимодействия с С-белками или тирозинкиназами. Роль CD3 в случае mIgM, по-видимому, играет ассоциированный с mIgM гетеродимер, состоящий из двух соединенных дисульфидной связью (-S-S-) гликопротеинов с молекулярной массой 32-34 кДа (Ig-альфа) и 37-39 кДа (Ig-β и Ig-γ). Цепи β и γ являются продуктами одного гена и образуются в результате альтернативного сплайсинга. Обе цепи относятся к представителям указанного выше суперсемейства иммуноглобулинов и содержат во внеклеточной части по одному домену.

Участки этих полипептидов имеют консервативную последовательность, включающую 6 аминокислот. Распознавание анти-

гена Т-клетками усложнено вступлением в этот процесс антигенов ГКГ.

Захваченный фагоцитирующей Т-клеткой антиген после внутриклеточной переработки экспрессируется на клеточной поверхности в комплексе с антигенами ГКГ. Если данный комплекс включает антигены класса I, то он распознается Т-киллерами, если в комплекс входят антигены класса II, то в реакцию вступают Т-хелперы.

Toll-подобные рецепторы

Toll-подобные рецепторы или TLR относятся к филогенетически наиболее древним сигнальным рецепторам клетки. Это трансмембранные белки, содержащие в своей внеклеточной части фрагменты, состоящие из множества остатков лейцина, формирующих бета-цепи и альфа-спирали, которые непосредственно взаимодействуют с паттернами патогенов (см. выше).

У человека идентифицировано 11 типов TLR. Их экспрессия клетками иммунной системы приведена в табл. 10.

Следует отметить, что TLR 1, 2, 4-6, 10 и 11 экспрессируются в ответ на компоненты бактериальных стенок патогенов. В свою очередь, TLR3, 7-9 специфичны к нуклеиновым кислотам бактериального и вирусного происхождения, в том числе TLR3 узнает двухцепочечную РНК, TLR8 и TLR9 активируются одноцепочечными РНК, богатыми гуанином и урацилом либо РНК, содержащими poly-U мотивы; TLR7 взаимодействует с одноцепочечной РНК вируса гриппа и ВИЧ, повышает синтез альфа-интерферона и противовоспалительных цитокинов; TLR9 взаимодействует с неметилованными CpG-повторами ДНК вирусов и бактерий.

Таблица 10. Экспрессия Toll-подобных рецепторов клетками иммунной системы (по Iашепш S., Beyaert R., 2003)

Рецептор	Клетки иммунной системы	Факторы регуляции экспрессии
TLR1	ДК, МФ, НК, Мо, НФ, В- и Т-лимфоциты	ФГА в Т-лимфоцитах
TLR2	Мо, ДК, МФ, НК, В- и Т-лимфоциты, базофилы, тучные клетки	ЛПС
TLR3	Незрелые миелоидные ДК, НК, НФ	Гамма-интерферон
TLR4	МФ, Мо, НФ, НК, В- и Т-лимфоциты, эозинофилы, базофилы, тучные клетки	Противовоспалительные цитокины и сами патогены
TLR5	Мо, МФ, НФ, миелоидные ДК, Т-лимфоциты, НК, тучные клетки	Противовоспалительные цитокины и ЛПС
TLR6	В- и Т-лимфоциты, Мо, НК, МФ, тучные клетки, миелоидные ДК	Патогены
TLR7	Мо, НФ, плазматцитоидные ДК, НК, эозинофилы, Т-лимфоциты, ПЯЛ	ИЛ-6
TLR8	Мо, НФ, МФ, миелоидные ДК, Т-лимфоциты, ПЯЛ	Гамма-интерферон и ЛПС
TLR9	Мо, РФ, плазматцитоидные ДК, НК, Т- и В-лимфоциты, тучные клетки, ПЯЛ	Гамма-интерферон и ЛПС
TLR10	В-лимфоциты, плазматцитоидные ДК, тучные клетки	Противовоспалительные цитокины и ЛПС
TLR11	Клетки эпителия слизистых оболочек, клетки эндотелия	Уропатогены

Примечание. ДК - дендритные клетки, МФ - макрофаги, НК - естественные киллеры, Мо - моноциты, НФ - нейтрофилы, ИЛ-6 - интерлейкин, ФГА - фитогемагглютинин, ЛПС - липополисахарид, ПЯЛ - полиморфноядерные лимфоциты.

Основные реакции и связанные с ними нарушения иммунного ответа

Нарушения иммунитета в ответ на действие антигенов называются иммунопатологией, которая проявляется в двух основных формах: гиперчувствительность (воспаление или аутоиммунная реакция) и иммунодефицитное состояние.

В первом случае говорят о патологических реакциях гиперчувствительности и аутоиммунных болезнях (когда собственные клетки организма приобретают антигенные свойства и к ним вырабатываются антитела).

Во втором случае говорят о патологических состояниях, при которых (несмотря на поступление антигенного материала) иммунные реакции не разворачиваются в результате несостоятельности иммунитета, которая может быть наследственной или приобретенной.

РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НА АНТИГЕН

Системы иммунитета организма характеризуются реакциями гиперчувствительности четырех типов: I тип (немедленный), II и III типы, IV тип (замедленный). Первые три типа реакций имеют гуморальный характер (обеспечиваются антителами), и первое поступление антигена приводит к каскадной активации систем иммунитета. Последний IV тип имеет клеточный характер.

Реакции немедленного I типа

Реакции немедленного I типа сопровождают процесс воспаления и обычно протекают без грубых структурных и функциональных нарушений (носят транзиторный характер). Первое поступление антигена активирует иммунитет, приводит к синтезу IgE. Затем эти антитела (реагины) фиксируются на поверхности клеточной мембраны базофилов ткани (и крови), так как они имеют высокое сродство (аффинность) к Fc-рецепторам тучных клеток. Этот синтез длится 1 нед и дольше.

При повторном попадании того же антигена он снова взаимодействует с IgE, что вызывает дегрануляцию цитоплазмы базофилов ткани и крови, в ходе которой из нее выходят медиаторы (гистамин и ферменты), участвующие в синтезе брадикинина и лейкотриенов, которые вызывают вазодилатацию, увеличивают сосудистую проницаемость и сокращают гладкую мускулатуру. При этом базофилы выделяют хемотаксические факторы для привлечения нейтрофилов и эозинофилов и активируют свертывание крови и систему комплемента, что ведет к дополнительной дегрануляции.

Реакции II типа

Реакции II типа характеризуются выработкой и взаимодействием антител с антигенами на поверхности клеток-мишеней, что приводит к их разрушению. При этом антиген может быть внешним (например, лекарство, которое при соединении с белком клеточной мембраны стимулирует иммунный ответ) либо собственным, который ошибочно распознается как чужеродный антиген (по неизвестным причинам) и обуславливает цитотоксический эффект Т-клеток или опосредованный белками и факторами комплемента лизис клеток-мишеней. Во втором случае это является причиной аутоиммунного заболевания.

Реакции этого типа происходят в организме при контактах с антигенами групп крови, клетками и тканями при трансплантации и во время беременности. В ходе этих реакций образующиеся антитела могут повреждать клетки и ткани в результате активации комплемента, а также путем связывания и активации эффекторных клеток, несущих рецепторы Fc-гамма (как и в случае реакций I типа). Например, такие антитела против собственных нейтрофилов и лимфоцитов производятся при тромбоцитопении и системной красной волчанке, против тромбоцитов - при тромбоцитопенической пурпуре.

Материнские антитела к антигенам крови плода, проходя через плаценту, разрушают эритроциты, вызывая гемолитическую болезнь новорожденных. Среди гемолитических анемий выделены типа A, B, вызванные тепловыми и холодowymi аутоантителами (соответственно $t\ 37\ ^\circ\text{C}$ и ниже), а также антителами, образующимися в ответ на введение лекарственных препаратов.

При беременности в реакциях этого типа часто участвует антиген резус D (RhD). Если при резус-конflikте (мать имеет Rh⁺, у ребенка Rh⁻) во время первой беременности ребенок, как правило, здоров, то при повторных беременностях риск гемолитической болезни резко возрастает. Повреждения тканей могут быть вызваны аутоантителами к базальным мембранам при нефрите или синдроме Гудпасчера, к молекулам межклеточной адгезии при пузырчатке, к рецепторам ацетилхолина на мембранах мышц при миастении.

Реакции III типа

При реакциях III типа в тканях происходит накопление иммунных комплексов, что ведет к активации белков и факторов комплемента, сопровождается повреждением тканей и развитием острого воспаления, т.е. обуславливает развитие иммунокомплексного заболевания. Болезни иммунных комплексов развиваются при затяжном инфицировании

или аутоиммунных заболеваниях. Они имеют системный характер, если вызываются циркулирующими в крови антителами (например, сывороточная болезнь), или локальный характер, когда иммунный комплекс формируется в месте поступления антигена (например, феномен Артюса). При этом система комплемента способствует разрыву связей между антигеном и антителом, что поддерживает нахождение комплекса в растворенном состоянии. Если при недостаточности комплемента образуются слабые связи (слабые

комплексы), то комплексы откладываются в тканях, особенно в почечных клубочках. При сывороточной болезни они откладываются в стенках сосудов, нарушают их проницаемость, вызывают воспаление, артроз или гломерулонефрит.

Болезни иммунных комплексов связаны с:

- персистенцией инфекции (сочетание хронической инфекции со слабым гуморальным ответом); примеры: проказа, малярия, геморрагическая лихорадка денге, вирусный гепатит, стафилококковый эндокардит;
- аутоиммунными заболеваниями, в ходе которых поражается («устаёт») система, ответственная за удаление комплексов (мононуклеарные фагоциты, эритроциты и комплемент), и в результате они начинают откладываться в тканях; примеры: ревматоидный артрит, системная красная волчанка и полимиозит;
- вдыханием антигенного материала, включающего компоненты актиномицетов, антигенов растительного (заплесневевшее сено), животного и другого происхождения.

В результате развиваются воспаление, аллергический альвеолит и фиброз - эти реакции могут протекать совместно с реакциями немедленного типа, обуславливая такую патологию, как «легкое фермера» или «легкое голубевода».

Безусловно, что сюда же следует отнести другие классы профессиональных заболеваний, например силикоз.

Реакции замедленного IV типа

У реакций этого типа клеточный характер. В данном случае при первом поступлении антигена происходит накопление сенсibilизированных Т-клеток, тогда как повторное поступление антигена приводит к образованию цитотоксических Т-клеток (рис. 55). Эти клетки способствуют выработке Т-хелперами клетками белков CD4 (кластер дифференциации). Эти белки обуславливают лизис чужеродных клеток (например, путем перфорации мембраны при освобождении белка-перфорина) либо вызывают их апоптоз. Прямая цитотоксичность Т-клеток играет важную роль в иммунном ответе на действие клеток, несущих чужеродные антигены или инфицированных вирусом, опухолевых или пересаженных клеток. Эти реакции вызываются сенсibilизированными антигенами Т-клеток, которые могут проявить свой цитотоксический эффект непосредственно или через секрецию цитокинов, приводящих к

воспалению, активации и привлечению макрофагов, что дополнительно усиливает воспаление.

В реакциях замедленного типа участвуют не антитела, а сами клетки. Механизм непосредственного действия наблюдается при ряде аутоиммунных болезней, контактном дерматите, в ходе иммунного ответа на влияние опухолевых клеток, клеток, инфицированных вирусом, пересаженных клеток, а также клеток, несущих чужеродные антигены. Обычно эти реакции возникают через 24-72 ч после введения антигена

сенсibilизированному человеку, что отличает их от реакций немедленного типа, которые развиваются в пределах нескольких минут. При первом поступлении антигена происходит первичное накопление сенсibilизированных Т-лимфоцитов. Повторное введение антигена приводит к возникновению вторичного иммунного ответа с образованием Т-киллеров, обуславливающих последующее гранулематозное воспаление и казеозный некроз.

Выделяют три типа реакции гиперчувствительности замедленного типа.

- *Контактная реакция*, когда нанесенный на кожу гаптен поглощается клетками Лангерганса, которые презентруют его антигенспе-

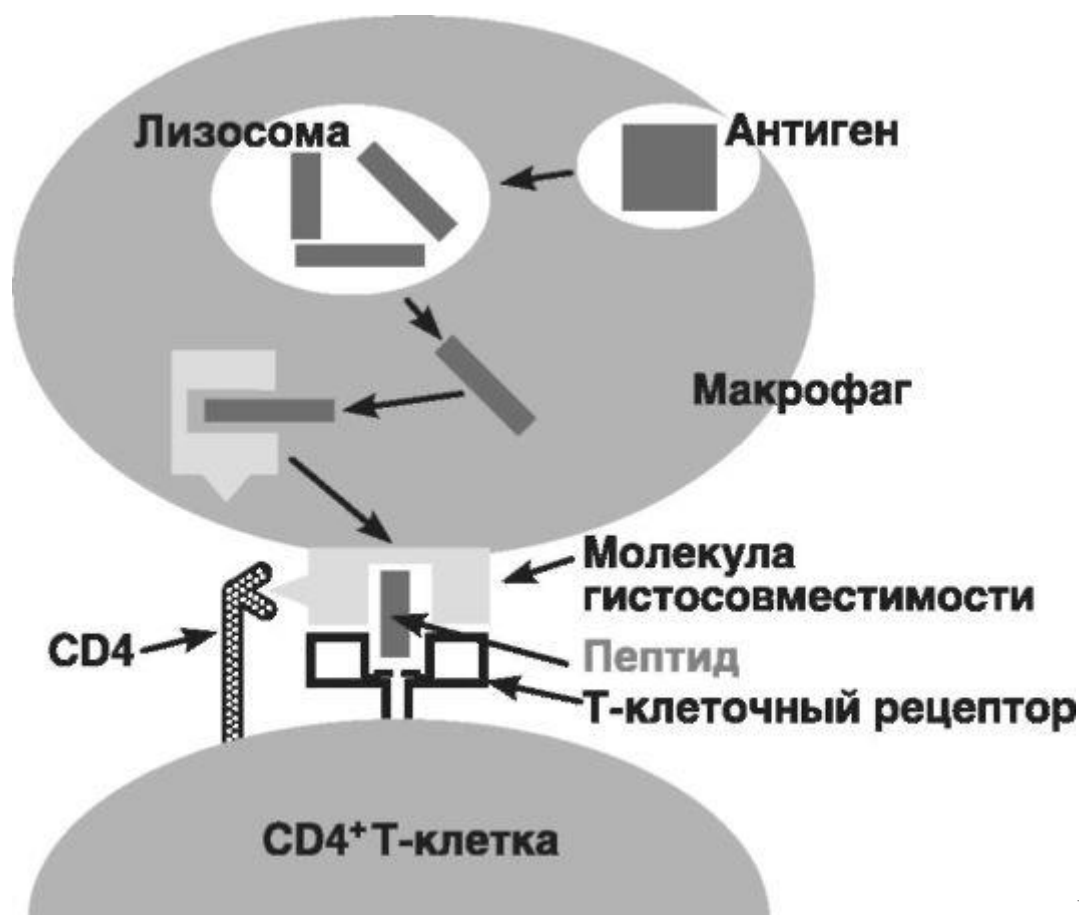


Рис.

55. Инициация иммунного ответа цитотоксической Т-клеткой (по Ройту А. и соавт., 2000)

цифичным Т-клеткам и вместе с кератиноцитами и макрофагами участвуют в этой реакции.

- *Туберкулиновая реакция* - диагностическая проба на присутствие в организме разных инфекционных агентов.

- *Гранулематозная реакция*. В этом случае возникает опосредованный Т-клетками баланс между иммунитетом к нерастворимому антигену и повреждением ткани. Гранулематозная реакция - это персистенция антигена, приводящая к дифференцировке макрофагов в эпителиальные клетки и их слиянию в гигантские клетки. Формирование гранул также зависит от ФНО. Примером реакции служит туберкулоидная форма проказы (лепра). Имеется множество примеров заболеваний человека, связанных с реакциями гиперчувствительности замедленного типа. Их причины: возбудители широко распространенных инфекций, лепры, туберкулеза и шистосомоза (черви), микобактерии, простейшие.

Вместе с тем, до сих пор не установлены причины таких заболеваний, как саркоидоз и болезнь Крона, при которых также наблюдаются реакции замедленного типа. Полагают, что в случае саркоидоза это результат накопления в тканях активированных макрофагов с последующим гранулематозом и фиброзом лимфоидной ткани и лимфоузлов, а в случае болезни Крона - это хроническое воспаление подвздошной и толстой кишок вследствие скопления в них макрофагов и лимфоцитов, что обуславливает сужение просвета кишечника и образование свищей в прилегающих тканях и органах.

Аллергические и атопические заболевания

Понятия аллергические и атопические заболевания часто путают. В патогенезе аллергических заболеваний играют роль реакции гиперчувствительности немедленного типа, тогда как в основе атопических заболеваний лежат реакции замедленного типа.

Аллерген - это антиген или участник иммунной реакции. Действие аллергенов внешней среды может проявиться покраснением кожи и даже появлением на ней волдырей.

Атопия - это реакция (заболевание) с участием аллергенов внешней среды. Следует отметить, что контакт с антигеном (аллергеном) приводит к образованию IgE у всех людей, тогда как атопическое заболевание возникает лишь у немногих.

В разных странах атопическими заболеваниями страдают 10-20% населения. К атопическим заболеваниям относятся: бронхиальная

астма, астматические бронхиты, сенная лихорадка, крапивница, непереносимость некоторых продуктов питания (в том числе пищевые аллергии). Как правило, эти заболевания проявляются как семейные формы.

В патогенезе атопических заболеваний важную роль играет наследственная предрасположенность, в частности наследование генов ГКГ. При этом возможно, что экспрессия генов предрасположенности (включая гены ГКГ) сочетается с повышенной способностью В-клеток секретировать IgE при контакте с аллергенами.

Кроме того, тяжесть атопического заболевания зависит от дозы, пути введения и продолжительности контакта с аллергеном, характера питания, хронического инфицирования, вирусных инфекций, применения лекарственных средств и наличия сопутствующих заболеваний. Вместе с тем, идентификация признаков аллергии у родителей ребенка с атопическим заболеванием является фактором риска развития у потомства этого заболевания. В частности, если аллергией страдают оба родителя, то риск для ребенка равен 50%, если один из родителей, то 30%.

КЛАССИФИКАЦИЯ НАРУШЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Нарушения иммунной системы проявляются у человека в виде разных классов заболеваний, включающих бактериальные и вирусные инфекции, аллергические (атопические), аутоиммунные, первичные и вторичные иммунодефицитные заболевания, а также иммунопролиферативные болезни (всего 6 классов). По диагностическим признакам, связанным с нарушениями иммунного ответа, среди них выделяют следующие.

- Инфекционные болезни. Для них характерны: длительный субфебрилитет, лихорадка неясной этиологии, хронические инфекции ЛОР-органов, лимфадениты, бронхиты, пневмонии, ОРВИ (4-6 раз в течение года), герпес, паразитарные инфекции, бактериальные и грибковые заболевания кожи и подкожной клетчатки (абсцессы, вульвиты, парапроктиты, пиодермия, флегмоны, фурункулез), ногтей и слизистых

оболочек (гнойные конъюнктивиты, кариес, пиелонефриты, уретриты, циститы, эндометриты).

- Аллергические (атопические) болезни. Среди них: атопический и контактный дерматит, крапивница, отек Квинке, феномен Артюса, экзема, аллергия ЛОР-органов, астматический бронхит, бронхиальная астма, гиперчувствительные пневмониты, непереносимость пищевых продуктов, лекарств, химических соединений.
- Аутоиммунные болезни и аутоиммунные формы заболеваний. Сюда относятся: воспалительные заболевания опорнодвигательного аппарата, болезнь Аддисона, болезни печени, гипертиреоз и другие болезни щитовидной железы, гломерулонефриты, дерматомиозит, ревматоидный артрит, синдромы Шегрена, Фелти), системная красная волчанка, системные васкулиты (васкулит Вегенера, узелковый периартериит и др.), склеродермия, неврологические заболевания (рассеянный склероз, миастения гравис), инсулинзависимый сахарный диабет, неспецифический язвенный колит, цитопенические болезни крови. К этому классу болезней следует также отнести аутоиммунные формы бесплодия, патологию беременности, психопатологию (например, шизофрения и др.).
- Первичные иммунодефициты детского возраста. Среди них: синдромы Вискотта-Олдрича, Ди-Джорджи и Луи-Бар, наследственные ангионевротические отеки и др.
- Вторичные иммунодефициты, включая алопецию, все проявления хронических инфекционных заболеваний с генерализацией и торпидным к терапии течением, де- и гиперпигментацию кожи, СПИД и случаи приобретенной иммунной недостаточности.
- Лимфопролиферативные заболевания: гиперплазия лимфоузлов, сочетающаяся с воспалением и очагами бактериальной инфекции (вне лимфоузлов), опухоли иммунной системы (болезнь Ходжкина, лимфолейкозы, лимфомы, лимфосаркомы, саркома Капоши), последствия спленомегалии и инфекционного мононуклеоза, X-сцепленный лимфопролиферативный синдром у детей .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунная система функционирует в тесном взаимодействии с нервной и эндокринной системами организма, в пользу чего получено много доказательств.

На клетках иммунной системы выделены рецепторы к гормонам (кортикостероиды, инсулин, СТГ, тестостерон) и другим биологически активным веществам - ацетилхолину, бета-адренергическим медиаторам, эндорфинам, энкефалинам, эстрадиолу.

Одни гормоны (глюкокортикоиды, андрогены, эстрогены и прогестерон) подавляют иммунные реакции, тогда как другие (инсулин, тироксин и СТГ) наоборот их стимулируют.

Функции медиаторов ЦНС выполняют интерлейкины, например ИЛ-2, продуцируемый клетками нервной ткани, влияет на пролиферацию олигодендроцитов.

Иммунитет в целом контролируется гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системой. В частности, нейроэмоциональный стресс оказывает значительное влияние на активность иммунитета у спортсменов-профессионалов, индуцируя у них транзиторный иммунодефицит. В последние годы в основном завершено исследование генов системы иммунитета, геновая сеть которого включает около 2200 генов, или 6% генов генома. Из общего числа этих генов 633 гена (около 30%) находятся в неактивном состоянии, т.е. кодируемые ими белки не экспрессируются. Изучены функции примерно половины

оставшихся 1557 генов, в том числе показано участие 130 генов в развитии нарушений иммунитета.

Подтверждением общности молекулярно-генетических причин и механизмов иммунного ответа с одной стороны и реакции отторжения клеток трансплантата от клеток организма хозяина с другой стороны стало открытие генов HLA-системы, включающей 220 генов, тесно сцепленных между собой и локализованных на хромосоме 6.

В базе данных нуклеотидных последовательностей ДНК содержится информация о более 1,5 тыс. аллелей генов этого комплекса, наследуемых по моногенному варианту.

Определена хромосомная локализация генов, кодирующих различные иммуноглобулины и антигенсвязывающие рецепторы, и изучены генетические причины их разнообразия.

Связи иммунной системы с другими регуляторными и защитными системами организма можно обнаружить в общности симптоматики при целом ряде бактериальных, вирусных, аллергических, атопических, аутоиммунных, иммунодефицитных и иммунопролиферативных болезней.

Активация локальных иммунных реакций при внутриутробном инфицировании зародыша и хроническом эндометриозе у матери

обуславливает нарушение имплантации зародыша в стенку матки и последующее нарушение инвазии и развития хориона, что ведет к прерыванию беременности. Поэтому подходы к лечению указанных заболеваний должны быть системными, учитывающими неврологические, эндокринологические и иммунологические особенности проявляющейся у больных симптоматики, а современная профилактика таких нарушений должна строиться на основе требований по медико-генетическому консультированию больных и их родственников (см. главу 30).

ГЛАВА 16 ОНТОГЕНЕЗ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО НАРУШЕНИЯ

Общие данные

Репродуктивный процесс или воспроизводство человека осуществляется многозвеньевой системой репродуктивных органов, которые обеспечивают способность гамет к оплодотворению, зачатие, преимплантацию и имплантацию зиготы, внутриутробное развитие зародыша, эмбриона и плода, детородную функцию женщины, а также подготовку организма новорожденного к встрече с новыми условиями существования в окружающей внешней среде.

Онтогенез репродуктивных органов - это составная часть генетической программы общего развития организма, направленная на обеспечение оптимальных условий для воспроизводства потомства, начиная с формирования гонад и производимых ими гамет, их оплодотворения и кончая рождением здорового ребенка.

В настоящее время идентифицируется общая генная сеть, ответственная за онтогенез и формирование органов репродуктивной системы. В нее входят: 1200 генов, участвующих в развитии матки, 1200 генов простаты, 1200 генов яичек, 500 генов яичников и 39 генов, контролирующих дифференцировку зародышевых клеток. Среди них выделены гены, определяющие направление дифференцировки бипотенциальных клеток либо по мужскому, либо по женскому типу.

Все звенья репродуктивного процесса крайне чувствительны к отрицательному воздействию факторов среды, приводящему к нарушениям репродуктивной функции, мужскому и женскому бесплодию, появлению генетических и негенетических заболеваний.

ОНТОГЕНЕЗ ОРГАНОВ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

Ранний онтогенез

Онтогенез репродуктивных органов начинается с появления первичных половых клеток или гоноцитов, которые выявляются уже на

стадии двухнедельного эмбриона. Гоноциты мигрируют из области кишечной эктодермы через энтодерму желточного мешка в область зачатков гонад или половых валиков, где делятся путем митоза, формируя пул будущих зародышевых клеток (вплоть до 32 дня эмбриогенеза). Хронология и динамика дальнейшей дифференцировки гоноцитов зависят от пола развивающегося организма, при этом онтогенез гонад сопряжен с онтогенезом органов мочевыводящей системы и надпочечников, совместно формирующих пол.

В самом начале онтогенеза у трехнедельного эмбриона в области нефрогенного тяжа (производное промежуточной мезодермы) формируется зачаток канальцев первичной почки (предпочки) или пронефрос. На 3-4 нед развития каудальнее канальцев пронефроса (область нефротомы) формируется зачаток первичной почки или мезонефрос. К концу 4 нед на вентральной стороне мезонефроса начинают формироваться зачатки гонад, развивающиеся из мезотелия и представляющие собой индифферентные (бипотенциальные) клеточные образования, а пронефротические канальцы (протоки) соединяются с канальцами мезонефроса, которые называются вольфовыми протоками. В свою очередь парамезонефральные, или мюллеровы протоки формируются из участков промежуточной мезодермы, которые обособляются под влиянием вольфова протока.

На дистальном конце каждого из двух вольфовых протоков в зоне их вхождения в клоаку формируются выросты в виде зачатков мочеточников. На 6-8 нед развития они прорастают в промежуточную мезодерму и формируют канальцы метанефроса - это вторичная или окончательная (дефинитивная) почка, образуемая клетками, производными задних частей вольфовых каналов и нефрогенной ткани задней части мезонефроса.

Теперь рассмотрим онтогенез биологического пола человека.

Формирование мужского пола

Формирование мужского пола начинается на 5-6 нед развития эмбриона с преобразований вольфовых протоков и завершается к 5-му месяцу развития плода.

На 6-8 нед развития эмбриона из производных задних частей вольфовых каналов и нефрогенной ткани задней части мезонефроса по верхнему краю первичной почки прорастает мезенхима, формирующая половой тяж (шнур), который разделяется, соединяясь с канальцами первичной почки, впадающими в ее проток, и дает

начало семенным трубкам семенников. Из вольфовых же протоков формируются выводящие пути. Средняя часть вольфовых протоков удлиняется и преобразуется в выносящие протоки, а из нижней части образуются семенные пузырьки. Верхняя часть протока первичной почки становится придатком семенника (эпидидимис), а нижняя часть протока превращается в выносящий канал. После этого редуцируются (атрофируются) мюллеровы протоки, и от них остаются только верхние концы (морганья гидатида) и нижние концы (мужская маточка). Последняя находится в толще предстательной железы

(простаты) у места впадения семявыносящего протока в мочеиспускательный канал. Простата, семенники и куперовы (бульбоуретральные) железы развиваются из эпителия стенки мочеполювого синуса (мочеиспускательного канала) под влиянием тестостерона, уровень которого в крови 3-5-мес плода достигает такового в крови половозрелого мужчины, что обеспечивает маскулинизацию половых органов.

Под контролем тестостерона из вольфовых протоков и канальцев верхнего мезонефроса развиваются структуры внутренних мужских половых органов, а при воздействии дигидротестостерона (производное тестостерона) формируются наружные мужские половые органы. Мышечные и соединительнотканые элементы простаты развиваются из мезенхимы, а просветы простаты формируются уже после рождения в пубертатном периоде. Половой член формируется из зачатка головки члена в половом бугорке. При этом половые складки срастаются и образуют кожную часть мошонки, в которую через паховый канал врастают выпячивания брюшины, в которые затем смещаются яички. Смещение яичек в область таза к месту будущих паховых каналов начинается у 12-недельного эмбриона. Оно зависит от действия андрогенов и хорионического гормона и происходит за счет смещения анатомических структур. Яички проходят через паховые каналы и достигают мошонки только на 7-8 мес развития. В случае задержки опускания яичек в мошонку (из-за разных причин, включая генетические) развивается одноили двусторонний крипторхизм.

Формирование женского пола

Формирование женского пола происходит при участии мюллеровых протоков, из которых на 4-5 нед развития образуются зачатки внутренних женских половых органов: матка, фаллопиевы трубы,

верхние две трети влагалища. Канализация влагалища, образование полости, тела и шейки матки происходят только у 4-5-месячного плода путем развития мезенхимы из основания тела первичной почки, что способствует уничтожению свободных концов половых шнуров.

Мозговая часть яичников образуется из остатков тела первичной почки, а из полового валика (зачаток эпителия) продолжается врастание половых шнуров в корковую часть будущих яичников. В результате дальнейшего прорастания эти тяжи делятся на примордиальные фолликулы, каждый из которых состоит из гоноцита, окруженного слоем фолликулярного эпителия, - это резерв для образования в ходе овуляции будущих зрелых ооцитов (около 2 тыс.). Врастание половых тяжей продолжается после рождения девочки (до конца первого года жизни), но новые примордиальные фолликулы уже не образуются.

В конце первого года жизни мезенхима отделяет начало половых шнуров от половых валиков, и этот слой формирует соединительнотканную (белочную) оболочку яичника, поверх которой сохраняются остатки половых валиков в виде неактивного зачаткового эпителия.

Уровни дифференцировки пола и их нарушения

Пол человека тесно связан с особенностями онтогенеза и репродукции. Выделяют 8 уровней дифференцировки пола:

- генетический пол (молекулярный и хромосомный), или пол на уровне генов и хромосом;
- гаметный пол, или морфогенетическая структура мужских и женских гамет;

- гонадный пол, или морфогенетическая структура семенников и яичников;
- гормональный пол, или баланс мужских или женских половых гормонов в организме;
- соматический (морфологический) пол, или антропометрические и морфологические данные о половых органах и вторичных половых признаках;
- психический пол, или психическое и сексуальное самоопределение индивида;
- социальный пол, или определение роли индивида в семье и обществе;
- гражданский пол, или пол, регистрируемый при выдаче паспорта. Его также называют полом воспитания.

При совпадении всех уровней дифференцировки пола и нормализации всех звеньев репродуктивного процесса развивается человек с нормальным биологическим мужским или женским полом, нормальными половыми и генеративными потенциями, половым самосознанием, психосексуальной ориентацией и поведением.

Схема взаимосвязей между разными уровнями дифференцировки пола у человека приведена на рис. 56.

Началом дифференцировки пола следует считать 5 нед эмбриогенеза, когда путем разрастания мезенхимы формируется половой бугорок, потенциально представляющий собой либо зачаток головки полового члена, либо зачаток клитора - это зависит от формирования будущего биологического пола. Примерно с этого времени половые складки преобразовываются либо в мошонку, либо в половые губы. Во втором случае между половым бугорком и половыми складками открывается первичное половое отверстие. Любой уровень дифференцировки пола тесно связан с формированием как нормальной репродуктивной функции, так и ее нарушений, сопровождающихся полным или неполным бесплодием.

Генетический пол

Генный уровень

Генный уровень дифференцировки пола характеризуется экспрессией генов, определяющих направление половой дифференцировки бипотенциальных клеточных образований (см. выше) либо по мужскому, либо по женскому типу. Речь идет о целой генной сети, включающей гены, расположенные как на гоносомах, так и на аутосомах.

По состоянию на конец 2001 г.к генам, контролирующим онтогенез репродуктивных органов и дифференцировку зародышевых клеток, были отнесены 39 генов (Черных В.Б., Курило Л.Ф., 2001). По-видимому, теперь их стало еще больше. Рассмотрим наиболее важные из них.

Несомненно, что центральное место в сети генетического контроля дифференцировки пола по мужскому типу принадлежит гену SRY. Этот однокопийный, не имеющий интронов ген, локализован в дистальной части короткого плеча Y-хромосомы (Yp11.31-32). Он продуцирует фактор детерминации яичек (TDF), обнаруженный также у XX-мужчин и XY-женщин.



Рис.

56. Схема взаимосвязей между разными уровнями дифференцировки пола у человека (по Черных В.Б. и Курило Л.Ф., 2001). Гены, участвующие в дифференцировке гонад и онтогенезе половых органов: SRY, SOX9, DAX1, WT1, SF1, GATA4, DHH, DHT. Гормоны и рецепторы к гормонам: FSH (фолликулостимулирующий гормон), LH (лютеинизирующий гормон), AMH (антимюллеров гормон), AMHR (ген рецептора AMHR), T, AR (ген андрогенного рецептора), GnRH (ген гонадотропин-рилизинг-гормона), GnRH-R (ген рецептора GnRH), LH-R (ген рецептора LH), FSH-R (ген рецептора FSH). Знаки: «-» и «+» обозначают отсутствие и наличие эффекта

Изначально активация гена SRY происходит в клетках Сертоли, продуцирующих антимюллеров гормон, воздействующий на чувствительные к нему клетки Лейдига, что индуцирует развитие семенных канальцев и регрессию мюллеровых протоков в формирующемся мужском организме. В этом гене обнаружено большое количество точковых мутаций, связанных с дизгенезией гонад и/или инверсией пола.

В частности, ген SRY может быть делетирован на Y-хромосоме, а при конъюгации хромосом в профазе первого мейотического деления может транслоцироваться на X-хромосому или какую-либо аутосому, что также ведет к дисгенезии гонад и/или инверсии пола.

Во втором случае развивается организм XY-женщины, имеющей тяжевидные стрек-гонады при женских наружных гениталиях и феминизации телосложения (см. ниже).

Вместе с тем, вероятно формирование организма XX-мужчины, характеризующегося мужским фенотипом при женском кариотипе - это синдром де ля Шапелля (см. ниже). Транслокация гена SRY на X-хромосому во время мейоза у мужчин встречается с частотой 2% и сопровождается тяжелыми нарушениями сперматогенеза.

В последние годы отмечено, что в процесс половой дифференцировки по мужскому типу вовлечен целый ряд генов, расположенных вне зоны локуса SRY (их несколько десятков). Например, для нормального сперматогенеза требуется не только наличие гонад, дифференцированных по мужскому типу, но и экспрессия генов, контролирующих развитие зародышевых клеток. К таким генам относится ген фактора азооспермии AZF (Yq11), микроделеции которого вызывают нарушения сперматогенеза; при них отмечаются и почти нормальное количество сперматозоидов, и олигозооспермия. Важная роль принадлежит генам, расположенным на X-хромосоме и аутосомах.

В случае локализации на X-хромосоме это ген DAX1. Он локализован в Xp21.2-21.3, в так называемом доза-чувствительном локусе инверсии пола (DDS). Считается, что этот ген в норме экспрессируется у мужчин и участвует в контроле развития их семенников и надпочечников, что может привести к адреногенитальному синдрому (АГС). Например, обнаружено, что дупликация DDS-участка ассоциируется с инверсией пола у XY-индивидов, а его утрата сопровождается мужским фенотипом и X-сцепленной врожденной недостаточностью коры надпочечников. Всего в гене DAX1 выделены три типа мутаций: крупные делеции, однонуклеотидные делеции и замены оснований. Все они ведут к гипоплазии коры надпочечников и гипоплазии яичек вследствие нарушения диффе-

ренцировки стероидогенных клеток в ходе онтогенеза надпочечников и гонад, что проявляется АГС и гипогонадотропным гипогонадизмом из-за дефицита глюкокортикоидов, минералокортикоидов и тестостерона. У таких больных наблюдаются тяжелые нарушения сперматогенеза (вплоть до полного его блока) и дисплазия клеточной структуры яичек. И хотя у больных развиваются вторичные половые признаки, однако часто наблюдается крипторхизм вследствие дефицита тестостерона во время миграции яичек в мошонку.

Другим примером локализации гена на X-хромосоме служит ген SOX3, принадлежащий к семейству SOX и относящийся к генам раннего развития (см. главу 12).

В случае локализации генов на аутосомах это, во-первых, ген SOX9, родственник гену SRY и содержащий HMG-бокс. Ген локализован на длинном плече хромосомы 17 (17q24-q25). Его мутации вызывают кампомелическую дисплазию, проявляющуюся множественными аномалиями скелета и внутренних органов. Кроме того, мутации гена SOX9 приводят к XY-инверсии пола (больные с женским фенотипом и мужским кариотипом). У таких больных наружные половые органы развиты по женскому типу или имеют двойственное строение, а их дисгенетические гонады могут содержать единичные половые клетки, но чаще представлены стрик-структурами (тяжами).

Следующие гены - это группа генов, регулирующих транскрипцию в ходе дифференцировки клеток, участвующих в онтогенезе гонад. Среди них гены WT1, LIM1, SF1 и GATA4. Причем первые 2 гена участвуют в первичной, а вторые два гена - во вторичной детерминации пола.

Первичная детерминация гонад по полу начинается с 6-недельного возраста эмбриона, а вторичная дифференцировка обусловлена гормонами, которые вырабатываются семенниками и яичниками.

Рассмотрим некоторые из этих генов. В частности, ген WT1, локализованный на коротком плече хромосомы 11 (11p13) и ассоциированный с опухолью Вилмса. Его экспрессия обнаружена в промежуточной мезодерме, дифференцирующейся в мезенхиму метанефроса и гонадах. Показана роль этого гена как активатора, коактиватора или даже репрессора транскрипции, необходимого уже на стадии бипотенциальных клеток (до стадии активации гена SRY).

Предполагается, что ген WT1 ответственен за развитие полового бугорка и регулирует выход клеток из целомического эпителия, дающего начало клеткам Сертоли.

Также считается, что мутации гена WT1 могут вызвать инверсию пола при дефиците регуляторных факторов, участвующих в половой дифференцировке. Нередко такие мутации связаны с синдромами, характеризующимися аутосомно-доминантным типом наследования, включая WAGR-синдром, синдром Денис-Дрэша и синдром Фрэзье.

Например, WAGR-синдром обусловлен делецией гена WT1 и сопровождается опухолью Вилмса, аниридией, врожденными пороками развития мочеполовой системы, умственной отсталостью, дисгенезией гонад и предрасположенностью к гонадобластомам.

Синдром Денис-Дрэша обусловлен миссенс-мутацией в гене WT1 и только иногда сочетается с опухолью Вилмса, но для него почти всегда характерны ранняя манифестация тяжелой нефропатии с потерей белка и нарушениями полового развития.

Синдром Фрэзье обусловлен мутацией в донорном сайте сплайсинга экзона 9 гена WT1 и проявляется дисгенезией гонад (женский фенотип при мужском кариотипе), поздним началом нефропатии и очаговым склерозом клубочков почек.

Рассмотрим также ген SF1, локализованный на хромосоме 9 и действующий как активатор (рецептор) транскрипции генов, участвующих в биосинтезе стероидных гормонов. Продукт этого гена активирует синтез тестостерона в клетках Лейдига и регулирует экспрессию ферментов, контролирующих биосинтез стероидных гормонов в надпочечниках. Кроме того, ген SF1 регулирует экспрессию гена DAX1, у которого в промоторе обнаружен SF1-сайт. Предполагается, что в ходе морфогенеза яичников ген DAX1 предотвращает транскрипцию гена SOX9 через репрессию транскрипции гена SF1. И наконец, ген CFTR, известный как ген муковисцидоза, наследуемый по аутосомно-рецессивному типу. Этот ген локализован на длинном плече хромосомы 7 (7q31) и кодирует белок, отвечающий за трансмембранный перенос ионов хлора. Рассмотрение этого гена уместно, так как у мужчин - носителей мутантного аллеля гена CFTR часто наблюдаются двустороннее отсутствие семявыносящих протоков и аномалии придатков яичек, приводящие к обструктивной азооспермии.

Хромосомный уровень

Как известно, яйцеклетка всегда несет одну X-хромосому, тогда как сперматозоид несет либо одну X-хромосому, либо одну Y-хромосому (их соотношение примерно одинаковое). Если яйцеклетка оплодот-

воряется сперматозоидом с X-хромосомой, то у будущего организма формируется женский пол (кариотип: 46, XX; содержит две одинаковые гоносомы). Если яйцеклетка оплодотворяется сперматозоидом с Y-хромосомой, то формируется мужской пол (кариотип: 46, XY; содержит две разные гоносомы).

Таким образом, формирование мужского пола в норме зависит от наличия в хромосомном наборе одной X- и одной Y-хромосомы. В дифференцировке пола решающая роль принадлежит Y-хромосоме. Если ее нет, то дифференцировка пола идет по женскому типу независимо от числа X-хромосом. В настоящее время на Y-хромосоме идентифицированы 92 гена. Помимо генов, формирующих мужской пол, на длинном плече этой хромосомы локализованы:

- GBY (ген гонадобластомы) или онкоген, инициирующий опухоль в дисгенетичных гонадах, развивающихся при мозаичных формах с кариотипом 45,X/46,XY у лиц с мужским и женским фенотипом;
- GSY (локус контроля роста), находящийся в проксимальной части Yq11; его утрата или нарушение последовательностей обуславливает низкорослость;
- SHOX (локус псевдоаутосомного региона I), участвующий в контроле роста;
- ген белка клеточных мембран или H-Y-антиген гистосовместимости, ранее ошибочно считавшийся главным фактором детерминации пола.

Теперь рассмотрим нарушения генетического пола на хромосомном уровне. Такого рода нарушения, как правило, связаны с неправильным расхождением хромосом в анафазе митоза и профазе мейоза, а также с хромосомными и геномными мутациями, в результате которых вместо наличия двух одинаковых или двух разных гоносом и аутосом могут быть:

- Числовые аномалии хромосом, при которых в кариотипе выявляются одна и более дополнительные гоносомы или аутосомы, отсутствие одной из двух гоносом или их мозаичные варианты. Среди примеров таких нарушений: синдромы Клайнфельтера - полисомия по X-хромосоме у мужчин (47, XXY), полисомия по Y-хромосоме у мужчин (47, XYY), синдром трипло-X (полисомия по X-хромосоме у женщин (47, XXX), синдром Шерешевского - Тернера (моносомия по X-хромосоме у женщин, 45, X0), мозаичные случаи анеуплоидии по гоносомам; маркерные
- или мини-хромосомы, происходящие от одной из гоносом (ее дериваты), а также синдромы трисомии по аутосомам, в том числе синдром Дауна (47, XX,+21), синдром Патау (47, XY,+13) и синдром Эдвардса (47, XX,+18)). Структурные аномалии хромосом, при которых в кариотипе выявляется часть одной гоносомы или аутосомы, что определяется как микро- и макроделеции хромосом (потеря отдельных генов и целых участков соответственно). К числу микроделений относятся: делеция участка длинного плеча Y-хромосомы (локус Yq11) и связанная с ней потеря локуса AZF или фактора азооспермии, а также делеция гена SRY, приводящая к нарушениям сперматогенеза, дифференцировки гонад и инверсии пола XY. В частности, в локусе AZF имеется ряд генов и генных семейств, ответственных за определенные стадии сперматогенеза и фертильность у мужчин. В локусе три активных субрегиона: a, b и c. Лocus присутствует во всех клетках, кроме эритроцитов. Однако locus активен только в клетках Сертоли.

Считается, что частота мутаций локуса AZF в 10 раз выше, чем частота мутаций в аутосомах. Причиной мужского бесплодия служит высокий риск передачи сыновьям Y-делетий, затрагивающих этот locus. В последние годы исследование локуса стало обязательным правилом при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО), а также у

мужчин с показателем сперматозоидов менее 5 млн/мл (азооспермия и олигоспермия тяжелой степени).

К числу макроделений относятся: синдром де ля Шапелля (46,XX-мужчина), синдром Вольфа-Хиршхорна (46, XX,4p-), синдром «кошачьего крика» (46, XY,5p-), синдром частичной моносомии хромосомы 9 (46, XX, 9p-). Например, синдром де ля Шапелля - это гипогонадизм при мужском фенотипе, мужской психосоциальной ориентации и женском генотипе. По клинике имеет сходство с синдромом Клайнфельтера, сочетается с гипоплазией яичек, азооспермией, гипоспадией (дефицит тестостерона вследствие внутриутробной недостаточности его синтеза клетками Лейдига), умеренно выраженной гинекомастией, глазной симптоматикой, нарушением сердечной проводимости и задержкой роста. Патогенетические механизмы тесно связаны с механизмами истинного гермафродитизма (см. ниже). И та, и другая патологии развиваются спорадически, часто в одних и тех же семьях; большинство случаев SRY - негативные.

Кроме микро- и макроделений, выделяют пери- и парацентрические инверсии (участок хромосомы переворачивается на 180° внутри хромосомы с вовлечением центромеры или внутри плеча без вовлечения центромеры). По последней номенклатуре хромосом, инверсия обозначается символом Ph. У больных с бесплодием и невынашиванием беременности часто выявляются мозаичный сперматогенез и олигоспермия, связанные с инверсиями следующих хромосом:

- хромосома 1; часто наблюдается Ph 1p34q23, вызывающая полный блок сперматогенеза; реже выявляется Ph 1p32q42, приводящая к блоку сперматогенеза на стадии пахитены;
- хромосомы 3, 6, 7, 9, 13, 20 и 21.

Реципрокные и нереципрокные транслокации (взаимный равный и неравный обмен между негомологичными хромосомами) встречаются между хромосомами всех классифицированных групп. Примером реципрокной транслокации является Y-аутосомная транслокация, сопровождающаяся нарушением дифференцировки пола, репродукции и бесплодием у мужчин вследствие аплазии сперматогенного эпителия, торможения или блока сперматогенеза. Другой пример - редкие транслокации между гомосомами X-Y, Y-Y. Фенотип у таких больных может быть женским, мужским или двойственным. У мужчин с транслокацией Y-Y наблюдается олигоили азооспермия в результате частичного или полного блока сперматогенеза на стадии образования сперматоцита I.

Особый класс - это транслокации робертсоновского типа между акроцентрическими хромосомами. Они встречаются у мужчин с нарушением сперматогенеза и/или бесплодием чаще, чем реципрокные транслокации. Например, робертсоновская транслокация между хромосомами 13 и 14 приводит либо к полному отсутствию сперматогониев в семенных канальцах, либо к незначительным изменениям их эпителия. Во втором случае мужчины могут сохранять фертильность, хотя чаще всего у них обнаруживается блок сперматогенеза на стадии сперматоцитов. К классу транслокаций относятся также полицентрические или дицентрические хромосомы (с двумя центромерами) и кольцевые хромосомы (центрические кольца). Первые возникают в результате обмена двух центрических фрагментов гомологичных хромосом, они выявляются у пациентов с нарушением репродукции. Вторые представляют собой замкнутые в кольцо структуры с вовлечением центромеры. Их образование связано с повреждением обоих плеч хромосомы, в результате чего свободные концы ее фрагмента,

содержащего центромеру, соединяются между собой. Носители центрических колец, как правило, бесплодны вследствие нарушения конъюгации хромосом в мейозе, что вызывает остановку сперматогенеза на стадии сперматоцитов.

Гаметный пол

Для иллюстрации возможных причин и механизмов нарушений гаметного уровня дифференцировки пола рассмотрим на основе данных электронной микроскопии процесс образования гамет в ходе нормального мейоза. На рис. 57 приведена модель синаптонемного комплекса (СК), отражающая последовательность событий при синапсисе и десинапсисе хромосом, участвующих в кроссинговере.

На начальной стадии первого деления мейоза, соответствующей окончанию интерфазы (стадия пролептотены), гомологичные родительские хромосомы деконденсированы, и в них видны начинающие формироваться осевые элементы. Каждый из двух элементов включает две сестринские хроматиды (соответственно 1 и 2, а также 3 и 4). На этой и следующей (второй) стадии - лептотене - происходит непосредственное формирование осевых элементов гомологичных хромосом (видны петли хроматина). Начало третьей стадии - зиготены - характеризуется подготовкой к сборке центрального элемента СК, а в конце зиготены начинается синапсис или конъюгация (слипание по

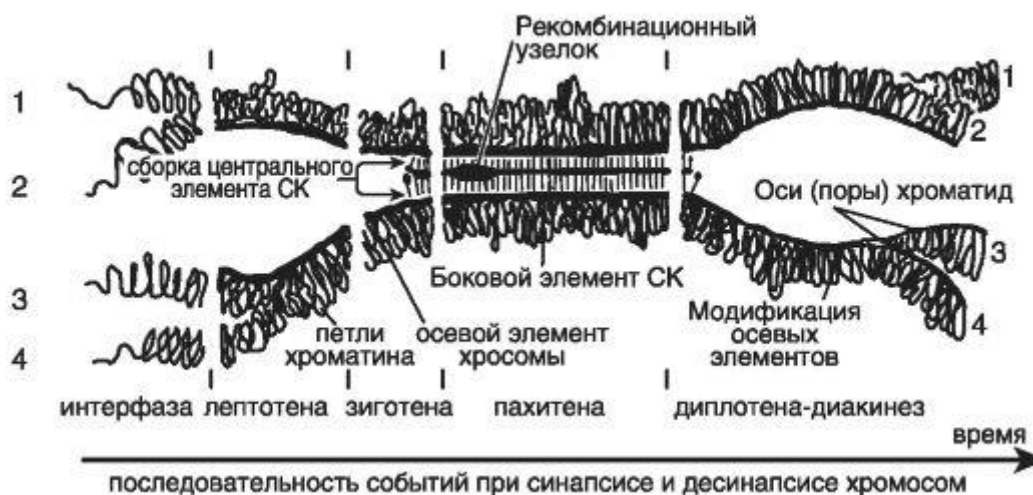


Рис.

57. Модель синаптонемного комплекса (по Preston D., 2000). Цифры 1, 2 и 3, 4 обозначают сестринские хроматиды гомологичных хромосом. Другие разъяснения приведены в тексте

длине) двух боковых элементов СК, совместно формирующих центральный элемент, или бивалент, включающий четыре хроматиды.

При прохождении зиготены гомологичные хромосомы ориентируются теломерными концами к одному из полюсов ядра. Формирование центрального элемента СК полностью завершается на следующей (четвертой) стадии - пахитене, когда в результате процесса конъюгации образуется гаплоидное число половых бивалентов. В каждом биваленте четыре хроматиды - это так называемое хромомерное строение. Начиная со стадии пахитены, половой бивалент постепенно смещается к периферии ядра клетки, где преобразуется в плотное половое тельце. В случае мужского мейоза это будет сперматозоид I порядка. На следующей (пятой) стадии - диплотене - завершается синапсис гомологичных хромосом и происходит их десинапсис или взаимное отталкивание. При этом СК постепенно редуцируется и сохраняется лишь в участках хиазм или зонах, в которых непосредственно происходит кроссинговер или

рекомбинационный обмен наследственным материалом между хроматидами (см. главу 5). Такие зоны называются рекомбинационными узелками.

Таким образом, хиазма - это участок хромосомы, в котором две из четырех хроматид полового бивалента вступают между собой в кроссинговер. Именно хиазмы удерживают гомологичные хромосомы в одной паре и обеспечивают расхождение гомологов к разным полюсам в анафазе I. Наступившее в диплотене отталкивание продолжается на следующей (шестой) стадии - диакинезе, когда происходит модификация осевых элементов с разделением осей хроматид. Диакинез завершается конденсацией хромосом и разрушением ядерной мембраны, что соответствует переходу клеток в метафазу I.

На рис. 58 приведено схематическое изображение осевых элементов или двух боковых (овальных) тяжей - стержней центрального пространства СК с формированием тонких поперечных линий между ними. В центральном пространстве СК между боковыми стержнями видна плотная зона наложения поперечных линий, и видны петли хроматина, отходящие от боковых стержней. Более светлый эллипс в центральном пространстве СК - это рекомбинационный узелок. В ходе дальнейшего мейоза (например, мужского) в наступившей анафазе II расходятся четыре хроматиды, формирующие униваленты по отдельным гомосомам X и Y, и таким образом из каждой делящейся клетки образуются четыре сестринские клетки, или сперматиды. Каждая сперматида имеет гаплоидный набор хромосом (редуцирована вдвое) и содержит перекомбинированный генетический материал.

В периоде половой зрелости мужского организма сперматиды вступают в сперматогенез и благодаря серии морфофизиологических трансформаций превращаются в функционально активные сперматозоиды.

Нарушения гаметного пола - это либо результат нарушенного генетического контроля миграции первичных половых клеток (ППК) в закладки гонад, что приводит к снижению количества или даже полному отсутствию клеток Сертоли (синдром клеток Сертоли), либо результат возникновения мейотических мутаций, обуславливающих нарушение конъюгации гомологичных хромосом в зиготене.

Как правило, нарушения гаметного пола вызваны аномалиями хромосом в самих гаметах, что, например, в случае мужского мейоза проявляется олиго-, азоо- и тератозооспермией, отрицательно сказывающейся на репродуктивной способности мужчины.

Показано, что аномалии хромосом в гаметах ведут к их элиминации, гибели зиготы, эмбриона, плода и новорожденного, обуславливают абсолютное и относительное мужское и женское бесплодие, являются причинами спонтанных абортов, замерших беременностей, мертворождений, рождений детей с пороками развития и ранней детской смертности.

Гонадный пол

Дифференцировка гонадного пола предусматривает создание в организме морфогенетической структуры гонад: или семенников, или яичников (см. выше рис. 54).

При изменениях гонадного пола, вызванных действием генетических и средовых факторов, основными нарушениями являются: аге-

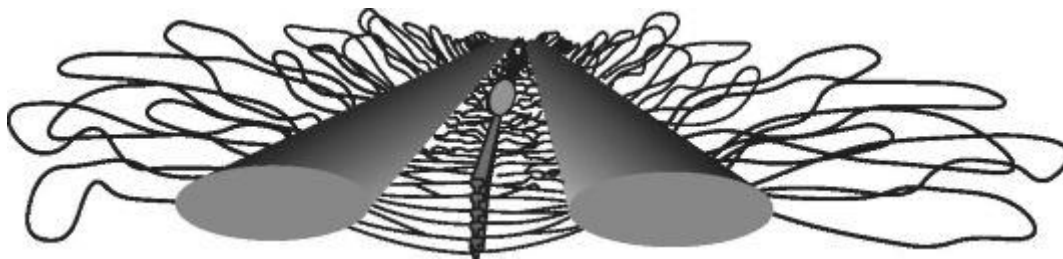


Рис.

58. Схематическое изображение центрального пространства синаптонемного комплекса (по Сорокиной Т.М., 2006)

незия или дисгенезия гонад (включая смешанный тип) и истинный гермафродитизм. Половая система обоих полов развивается в начале внутриутробного онтогенеза по единому плану параллельно с развитием выделительной системы и надпочечников - так называемая индифферентная стадия. Первая закладка половой системы в виде целомического эпителия происходит у зародыша на поверхности первичной почки - вольфово тело. Затем наступает стадия гонобластов (эпителий половых валиков), из которых развиваются гоноциты. Их окружают клетки фолликулярного эпителия, обеспечивающие трофику.

В строму первичной почки из половых валиков идут тяжи, состоящие из гоноцитов и фолликулярных клеток, и одновременно от тела первичной почки к клоаке идет мюллеров (парамезонефральный) проток. Далее идет раздельное развитие мужских и женских гонад. Происходит следующее.

А. Мужской пол . По верхнему краю первичной почки прорастает мезенхима, формирующая половой тяж (шнур), который разделяется, соединяясь с канальцами первичной почки, впадающими в ее проток, и дает начало семенным трубочкам семенников. При этом из почечных канальцев формируются выносящие канальцы. В дальнейшем верхняя часть протока первичной почки становится придатком семенника, а нижняя превращается в семявыносящий канал. Семенники и простата развиваются из стенки мочеполювого синуса.

Действие гормонов мужских гонад (андрогенов) зависит от действия гормонов передней доли гипофиза. Выработка андрогенов обеспечивается совместной секрецией интерстициальных клеток семенников, сперматогенного эпителия и поддерживающих клеток.

Простата - это железисто-мышечный орган, состоящий из двух боковых долек и перешейка (средняя долька). В простате около 30-50 желез, их секрет выбрасывается в семявыносящий проток в момент эякуляции. К продуктам, секретиремым семенными пузырьками и простатой (первичная сперма), по мере их продвижения по семявыносящему и мочеиспускательному каналам добавляется (в верхней части мочеиспускательного канала) мукоид и схожие с ним по составу продукты бульбоуретральных желез или куперовых клеток. Все эти продукты перемешиваются и выходят в виде дефинитивной спермы - жидкости со слабощелочной реакцией, в которой находятся сперматозоиды и содержатся необходимые для их функционирования вещества: фруктоза, лимонная кислота,

цинк, кальций, эрготонин, ряд ферментов (протеиназы, глюкозидазы и фосфатазы).

Б. Женский пол. Происходит развитие мезенхимы у основания тела первичной почки, что приводит к уничтожению свободных концов половых шнуров. При этом проток первичной почки атрофируется, а мюллеров проток, наоборот, дифференцируется. Его верхние части становятся маточными (фаллопиевыми) трубами, концы которых

раскрываются в виде воронок и охватывают яичники. Нижние части мюллеровых протоков сливаются и дают начало матке и влагалищу.

Мозговой частью яичников становятся остатки тела первичной почки, а от полового валика (зачаток эпителия) продолжается вращение половых шнуров в корковую часть будущих яичников. Продукты женских гонад - это фолликулостимулирующий гормон (эстроген) или фолликулин и прогестерон.

Рост фолликулов, овуляция, циклические изменения желтого тела, чередование продукции эстрогена и прогестерона определяются соотношениями (сдвигами) между гонадотропными гормонами гипофиза и специфическими активаторами адреногипофизотропной зоны гипоталамуса, контролирующей гипофиз. Поэтому нарушения регуляторных механизмов на уровне гипоталамуса, гипофиза и яичников, развившиеся, например, в результате опухолей, черепно-мозговых травм, инфицирования, интоксикаций или психоэмоциональных стрессов, расстраивают половую функцию и становятся причинами преждевременного полового созревания или нарушений менструального цикла.

Гормональный пол

Гормональный пол - это поддержание в организме баланса мужских и женских половых гормонов (андрогенов и эстрогенов). Детерминирующим началом развития организма по мужскому типу служат два андрогенных гормона: антимюллеров гормон, или AMH (MIS-фактор), вызывающий регрессию мюллеровых протоков, и тестостерон. MIS-фактор активируется под действием гена GATA4, локализованного в 19p13.2-33 и кодирующего белок - гликопротеин. Его промотор содержит сайт, распознающий ген SRY, с которым связывается консенсусная последовательность - AACAAAT/A.

Секреция гормона AMH начинается на 7 нед эмбриогенеза и продолжается до пубертатного возраста, затем резко падает у взрослых (с сохранением очень низкого уровня).

Предполагают, что AMH необходим для развития яичек, созревания сперматозоидов и ингибирования роста опухолевых клеток. Под контролем тестостерона из вольфовых протоков формируются внутренние мужские половые органы. Этот гормон превращается в 5-альфатестостерон, и с его помощью из мочеполювого синуса формируются наружные мужские половые органы.

Биосинтез тестостерона активируется в клетках Лейдига под действием активатора транскрипции, кодируемого геном SF1 (9q33).

Оба этих гормона оказывают и местное, и общее действие на маскулинизацию экстрагенитальных тканей-мишеней, чем обуславливают половой дисморфизм ЦНС, внутренних органов и размеров тела.

Таким образом, важная роль в окончательном формировании наружных мужских половых органов принадлежит андрогенам, вырабатываемым в надпочечниках и яичках. Причем необходимы не только нормальный уровень андрогенов, но их нормально функционирующие рецепторы, так как в противном случае развивается синдром нечувствительности к андрогенам (ATS).

Андрогенный рецептор кодируется геном AR, локализованным в Xq11. В этом гене идентифицировано свыше 200 точковых мутаций (в основном однонуклеотидных замен), связанных с инактивацией рецептора. В свою очередь, эстрогены и их рецепторы играют важную роль во вторичной детерминации пола у мужчин. Они необходимы для

улучшения их репродуктивной функции: созревания сперматозоидов (повышения их качественных показателей) и костной ткани.

Нарушения гормонального пола происходят вследствие дефектов биосинтеза и метаболизма андрогенов и эстрогенов, участвующих в регуляции строения и функционирования органов репродуктивной системы, что обуславливает развитие ряда врожденных и наследственных заболеваний, таких, как АГС, гипергонадотропный гипогонадизм и др. Например, наружные гениталии у мужчин формируются по женскому типу при дефиците или полном отсутствии андрогенов независимо от наличия или отсутствия эстрогенов.

Соматический пол

Нарушения соматического (морфологического) пола могут быть вызваны дефектами образования рецепторов половых гормонов в тканях (органах) - мишенях, что связано с развитием женского фенотипа с мужским кариотипом или синдрома полной тестикулярной феминизации (синдрома Морриса).

Синдром характеризуется X-сцепленным типом наследования и является наиболее частой причиной ложного мужского гермафродитизма, проявляющегося в полной и неполной формах. Это больные с женским фенотипом и мужским кариотипом. У них яички расположены внутрибрюшинно или по ходу паховых каналов. Наружные гениталии имеют разную степень маскулинизации. Производные мюллеровых протоков - матка, фаллопиевы трубы - отсутствуют, вагинальный отросток укорочен и слепо заканчивается.

Производные вольфовых протоков - семявыносящий проток, семенные пузырьки и придатки семенников - гипоплазированы в разной степени. В пубертате у больных отмечается нормальное развитие грудных желез, за исключением бледности и уменьшения диаметра ареол сосков, скудное оволосение лобка и подмышечных впадин. Иногда вторичное оволосение отсутствует. У больных нарушено взаимодействие андрогенов и их специфических рецепторов, поэтому генетические мужчины чувствуют себя как женщины (в отличие от транссексуалов). При гистологическом исследовании у них выявляются гиперплазия клеток Лейдига и клеток Сертоли, а также отсутствие сперматогенеза.

Примером неполной тестикулярной феминизации является синдром Рейфенштейна. Это, как правило, мужской фенотип с гипоспадией, гинекомастией, мужским кариотипом и бесплодием. Вместе с тем, может быть мужской фенотип со значительными дефектами маскулинизации (микропенис, промежностная гипоспадия и крипторхизм), а также женский фенотип с умеренной клитеромегалией и незначительным сращением половых губ. Кроме того, у фенотипических мужчин с полной маскулинизацией выделяют мягкую форму синдрома тестикулярной феминизации с гинекомастией, олигозооспермией или азооспермией.

Психический, социальный и гражданский пол

Рассмотрение нарушений психического, социального и гражданского пола у человека не является задачей этого учебного пособия, так как подобного рода нарушения касаются отклонений в половом самосознании и самовоспитании, половой ориентации и половой роли индивида и тому подобных психических, психологических и других социально значимых факторов полового развития.

Рассмотрим пример транссексуализма (одного из частых нарушений психического пола), сопровождающегося патологическим стремлением индивида к изменению своего пола. Нередко этот синдром

называют сексуально-эстетической инверсией (эолизмом) или психическим гермафродитизмом.

Аутоидентификация и половое поведение индивида закладываются еще во внутриутробном периоде развития организма через созревание структур гипоталамуса, что в некоторых случаях может обусловить развитие транссексуальности (интерсексуальности), т.е. двойственности строения наружных гениталий, например, при АГС. Такая двойственность приводит к неправильной регистрации гражданского (паспортного) пола. Ведущие симптомы: инверсия половой идентичности и социализации личности, проявляющаяся в отвергании своего пола, психосоциальной дизадаптации и аутодеструктивном поведении. Средний возраст больных, как правило, составляет 20-24 года. Мужской транссексуализм встречается значительно чаще женского (3:1). Описаны семейные случаи и случаи транссексуализма среди монозиготных близнецов.

Природа болезни неясна. Психиатрические гипотезы в целом не подтверждаются. В некоторой степени объяснением может быть гормональнозависимая дифференцировка мозга, происходящая параллельно с развитием гениталий. Например, показана связь уровня половых гормонов и нейротрансмиттеров во время критических периодов развития ребенка с половой идентификацией и психосоциальной ориентацией. Кроме того, предполагается, что генетической предпосылкой женского транссексуализма может быть недостаточность 21-гидроксилазы у матери или плода, вызванная пренатальным стрессом, частота которого значительно выше у больных по сравнению с обычной популяцией.

Причины транссексуализма можно рассматривать с двух позиций.

- *Первая позиция* - это нарушение дифференцировки психического пола вследствие несоответствия между дифференцировкой наружных гениталий и дифференцировкой полового центра мозга (опережение первой и отставание второй дифференцировки).
- *Вторая позиция* - это нарушение дифференцировки биологического пола и формирования последующего полового поведения в результате дефекта рецепторов половых гормонов или их аномальной экспрессии. Не исключено, что эти рецепторы могут быть расположены в структурах мозга, необходимых для формирования последующего полового поведения. Следует также отметить, что транссексуализм противоположен синдрому тестикулярной

феминизации, при котором у пациентов никогда не возникает сомнений в их принадлежности к женскому полу. Кроме того, этот синдром следует отличать от синдрома транссвестизма как психиатрической проблемы.

Классификации генетических нарушений репродукции

В настоящее время имеется множество классификаций генетических нарушений репродукции. Как правило, в них учитываются особенности дифференцировки пола, генетический и клинический полиморфизм при нарушениях полового развития, спектр и частота генетических, хромосомных и гормональных нарушений и другие особенности. Рассмотрим одну из последних, наиболее полных классификаций (Grumbach M. et al., 1998). В ней выделяют следующее.

I. Нарушения дифференцировки гонад.

- Истинный гермафродитизм.
- Дисгенезия гонад при синдроме Клайнфельтера.
- Синдром дисгенезии гонад и его варианты (синдром Шерешевского-Тернера).

- Полная и неполная формы XX-дисгенезии и XY-дисгенезии гонад. В качестве примера рассмотрим дисгенезию гонад при кариотипе 46,XY. Если ген SRY определяет дифференцировку гонад в яички, то его мутации приводят к дисгенезии гонад у XY-эмбрионов. Это лица с женским фенотипом, высоким ростом, мужским телосложением и кариотипом. У них выявляются женское или двойственное строение наружных гениталий, отсутствует развитие молочных желез, проявляется первичная аменорея, скудное половое оволосение, гипоплазия матки и фаллопиевых труб и самих гонад, которые представлены соединительнотканными тяжами, расположенными высоко в малом тазу. Нередко этот синдром называют чистой формой дисгенезии гонад с кариотипом 46,XY.

II. Женский ложный гермафродитизм.

- Андрогениндуцированный.
 - Врожденная гипоплазия коры надпочечников или АГС. Это распространенное аутосомно-рецессивное заболевание, которое в 95% случаев является результатом дефицита фермента 21-гидроксилазы (цитохром P450 C21). Подразделяется на «классическую» форму (частота в популяции 1:5000-10000 новорожденных) и «неклассическую» форму (частота 1:27-333) в зависимости от клинического проявления. Ген 21-гидроксилазы

(CYP21B) картирован на коротком плече хромосомы 6 (6p21.3). В этом локусе выделены два тандемно расположенных гена - функционально активный ген CYP21B и псевдоген CYP21A, неактивный вследствие либо делеции в экзоне 3, либо инсерции со сдвигом рамки считывания в экзоне 7, либо нонсенс-мутации в экзоне 8. Наличие псевдогена ведет к нарушениям спаривания хромосом в мейозе и, следовательно, к конверсии гена (перемещению фрагмента активного гена на псевдоген) или делеции части смыслового гена, что нарушает функцию активного гена. На долю конверсии гена приходится 80% мутаций, на долю делеций - 20% мутаций.

- Недостаточность ароматазы или мутация гена CYP 19, ARO (ген P450 - ароматазы), локализован в сегменте 15q21.1.

- Поступление андрогенов и синтетических прогестагенов от матери.

- Неандрогениндуцированный, вызванный тератогенными факторами и связанный с пороками развития кишечника и мочевыводящих путей.

III. Мужской ложный гермафродитизм.

- 1. Нечувствительность ткани яичек к ХГ и ЛГ (агенезия и гипоплазия клеток).
- 2. Врожденные дефекты биосинтеза тестостерона.
 - 2.1. Дефекты ферментов, влияющих на биосинтез кортикостероидов и тестостерона (варианты врожденной гиперплазии коры надпочечников):
 - дефект STAR (липоидная форма врожденной гиперплазии коры надпочечников);
 - недостаточность 3 бета-HSD (3 бетагидрокортикоиддегидрогеназы);
 - недостаточность гена CYP 17 (ген цитохрома P450C17) или 17альфа-гидроксилазы-17,20-лиазы.
 - 2.2. Дефекты ферментов, первично нарушающие биосинтез тестостерона в яичках:
 - недостаточность CYP 17 (ген цитохрома P450C17);

■ недостаточность 17 бета-гидростероиддегидрогеназы, тип 3 (17 бета-HSD3).

- 2.3. Дефекты чувствительности тканей-мишеней к андрогенам.

■ 2.3.1. Нечувствительность (резистентность) к андрогенам:

синдром полной тестикулярной феминизации (синдром

Морриса);

синдром неполной тестикулярной феминизации (болезнь Рейфенштейна);

нечувствительность к андрогенам у фенотипически нормальных мужчин.

■ 2.3.2. Дефекты метаболизма тестостерона в периферических тканях - дефицит 5 гамма-редуктазы (SRD5A2) или псевдовагинальная перинеоскротальная гипоспадия.

■ 2.3.3. Дисгенетический мужской псевдогермафродитизм :

неполная XY-дисгенезия гонад (мутация гена WT1) или синдром Фрэзе;

X/XY-мозаицизм и структурные аномалии (Xp+, 9p-,

10q-);

миссенс-мутация гена WT1 или синдром Денис-Дрэша; делеция гена WT1 или синдром WAGR; мутация гена SOX9 или кампомелическая дисплазия; мутация гена SF1;

X-сцепленная тестикулярная феминизация или синдром Морриса.

■ 2.3.4. Дефекты синтеза, секреции и ответа на антимюллеров гормон - синдром персистенции мюллеровых протоков

(СПМП).

■ 2.3.5. Дисгенетический мужской псевдогермафродитизм, вызванный материнскими прогестагенами и эстрогенами.

■ 2.3.6. Дисгенетический мужской псевдогермафродитизм, вызванный воздействием химических факторов среды.

IV. Неклассифицированные формы аномалий полового развития у мужчин: гипоспадия, двойственное развитие гениталий у XY-мужчин с мВПР.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРИЧИНЫ БЕСПЛОДИЯ

В качестве генетических причин бесплодия выделяют: синаптические и десинаптические мутации, аномальный синтез и сборку компонентов СК (см. выше гаметный пол).

Определенную роль играет аномальная конденсация гомологов хромосом, приводящая к маскировке и исчезновению точек инициации конъюгации и, следовательно, ошибкам мейоза, возникающим в любых его фазах и стадиях. Незначительная часть нарушений приходится на синаптические дефекты в профазе первого деления в

виде асинаптических мутаций, тормозящих сперматогенез до стадии пахитены в профазе I, что приводит к превышению числа клеток в лептотене и зиготене, отсутствию полового пузырька в пахитене, обуславливает наличие неконъюгирующего сегмента бивалента и не полностью сформированного синаптонемного комплекса.

Более частыми являются десинаптические мутации, которые блокируют гаметогенез до стадии метафазы I, вызывая дефекты СК, включая его фрагментацию, полное отсутствие или нерегулярность, а также асимметрию конъюгации хромосом.

Вместе с тем, могут наблюдаться частично синаптированные би- и мультисинаптонемные комплексы, их ассоциации с половыми XY-бивалентами, не смещающиеся на периферию ядра, а «заякоряющиеся» в его центральной части. В таких ядрах не образуются половые тельца, и клетки с этими ядрами подвергаются селекции на стадии пахитены - это так называемый пахитенный арест.

Классификация генетических причин бесплодия

В 2001 г. была опубликована наиболее полная классификация генетических причин бесплодия (Foresta D. et al., 2001). Согласно этой классификации, бесплодие у мужчин вызывают:

1. Гonosомные синдромы (включая мозаичные формы): синдромы Клайнфельтера (кариотипы: 47,XXY и 47, XYY); YY-анеуплоидии; инверсии пола (46,XX и 45,X - мужчины); структурные мутации Y-хромосомы (делеции, инверсии, кольцевые хромосомы, изохромосомы).
2. Аутосомные синдромы, обусловленные: реципрокными и робертсоновскими транслокациями; другими структурными перестройками (включая маркерные хромосомы).
3. Синдромы, обусловленные трисомией хромосомы 21 (болезнь Дауна), частичными дупликациями или делециями.
4. Хромосомные гетероморфизмы: инверсия хромосомы 9, или Ph (9); семейная инверсия Y-хромосомы; увеличенный гетерохроматин Y-хромосомы (Ygh+); увеличенный или уменьшенный перицентромерный конститутивный гетерохроматин; увеличенные или дублированные сателлиты акроцентрических хромосом.
5. Хромосомные aberrации в сперматозоидах: тяжелые первичные тестикулопатии (последствия лучевой терапии или химиотерапии).
6. Мутации Y-сцепленных генов (например, микроделеция в локусе AZF).
7. Мутации X-сцепленных генов: синдром нечувствительности к андрогенам; синдромы Кальмана и Кеннеди. Рассмотрим синдром Кальмана - это врожденное (часто семейное) нарушение секреции гонадотропинов у лиц обоего пола. Синдром обусловлен дефектом гипоталамуса, проявляющимся дефицитом гонадотропин-рилизинг-гормона, что ведет к снижению выработки гонадотропинов гипофизом и развитию вторичного гипогонадотропного гипогонадизма. Сопровождается дефектом обонятельных нервов и проявляется anosмией или гипосмией. У больных мужчин наблюдается евнухоидизм (яички по размерам и консистенции остаются на пубертатном уровне), отсутствует цветовое зрение, имеются врожденная глухота, расщелина губы и нёба, крипторхизм и костная патология с укорочением IV пястной кости. Иногда проявляется гинекомастия. При гистологическом исследовании выявляются незрелые семенные канальцы, выстланные клетками Сертоли, сперматогониями или первичными сперматоцитами. Клетки Лейдига отсутствуют, вместо них мезенхимальные предшественники, которые при введении гонадотропинов развиваются в клетки Лейдига. X-сцепленная форма синдрома Кальмана вызвана мутацией гена KAL1, кодирующего anosмин. Этот белок играет ключевую роль в миграции секретирующих клеток и росте обонятельных нервов к

гипоталамусу. Также описано аутосомно-доминантное и аутосомно-рецессивное наследование этого заболевания.

8. Генетические синдромы, при которых бесплодие является ведущим симптомом: мутации гена муковисцидоза, сопровождающиеся отсутствием vas deferens; CBAVD- и CUAVD-синдромы; мутации генов, кодирующих бета-субъединицу ЛГ и ФСГ; мутации генов, кодирующих рецепторы к ЛГ и ФСГ.

9. Генетические синдромы, при которых бесплодие не является ведущим симптомом: недостаточность активности ферментов стероидогенеза (21-бета-гидроксилаза и др.); недостаточность редуктазной активности; анемия Фанкони, гемохроматоз, бетаталассемия, миотоническая дистрофия, мозжечковая атаксия с гипогонадотропным гипогонадизмом; синдромы Барде-Бидля, Нунан, Прадера-Вилли и Прюна-Белли.

Бесплодие у женщин бывает при следующих нарушениях. 1. Гонасомные синдромы (включая мозаичные формы): синдром Шерешевского-Тернера; дисгенезия гонад с низким ростом -

кариотипы: 45,X; 45X/46,XX; 45,X/47,XXX; Xq-изохромосома; del (Xq); del (Xp); r(X).

2. Дисгенезии гонад с линией клеток, несущих Y-хромосому: смешанная дисгенезия гонад (45,X/46,XY); дисгенезия гонад при кариотипе 46,XY (синдром Свайера); дисгенезия гонад при истинном гермафродитизме с линией клеток, несущих Y-хромосому или имеющих транслокации между X-хромосомой и аутосомами; дисгенезия гонад при синдроме трипло-X (47,XXX), включая мозаичные формы.

3. Аутосомные синдромы, обусловленные инверсиями или реципрокными и робертсоновскими транслокациями.

4. Хромосомные aberrации в ооцитах женщин в возрасте старше 35 лет, а также в ооцитах женщин с нормальным кариотипом, у которых 20% ооцитов и более могут иметь хромосомные аномалии.

5. Мутации в X-сцепленных генах: полная форма тестикулярной феминизации; синдром ломкой X-хромосомы (FRAXA, синдром fraX); синдром Кальмана (см. выше).

6. Генетические синдромы, при которых бесплодие является ведущим симптомом: мутации в генах, кодирующих субъединицу ФСГ, рецепторы к ЛГ и ФСГ и рецептор гонадолиберина; синдромы BPES (блефарофимоз, птоз, эпикант), Денис-Дрэша и Фрэзье.

7. Генетические синдромы, при которых бесплодие не является ведущим симптомом: недостаточность ароматической активности; недостаточность ферментов стероидогенеза (21-бета-гидроксилаза, 17-бета-гидроксилаза); бета-талассемия, галактоземия, гемохроматоз, миотоническая дистрофия, муковисцидоз, мукополисахаридозы; мутации гена DAX1; синдром Прадера-Вилли.

Однако эта классификация не учитывает ряд наследственных заболеваний, связанных с мужским и женским бесплодием. В частности, в нее не вошла гетерогенная группа болезней, объединенных общим названием «аутосомно-рецессивный синдром Картагенера», или синдром неподвижности ресничек клеток реснитчатого эпителия верхних дыхательных путей, жгутиков сперматозоидов, фибрий ворсинок яйцеводов. Например, к настоящему времени идентифицировано более 20 генов, контролирующих формирование жгутиков сперматозоидов, включая ряд мутации генов

DNAH11 (9p21-p13) и DNAH5 (5p15-p14). Этот синдром характеризуется наличием бронхоэктазов, синуситов, полным или частичным обратным расположением внутренних

органов, пороками развития костей грудной клетки, врожденным пороком сердца, полиэндокринной недостаточностью, легочным и сердечным инфантилизмом. Мужчины и женщины с этим синдромом часто, но не всегда бесплодны, так как бесплодие у них зависит от степени повреждения двигательной активности жгутиков сперматозоидов или фибрий ворсинок яйцеводов. Кроме того, у больных наблюдаются вторично развившиеся аносмия, умеренное снижение слуха, полипы носовой полости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как составная часть общей генетической программы развития, онтогенез органов репродуктивной системы - это многозвеньевой процесс, крайне чувствительный к действию широкого спектра мутагенных и тератогенных факторов, обуславливающих развитие наследственных и врожденных заболеваний, нарушений репродуктивной функции и бесплодия. Поэтому онтогенез органов репродуктивной системы - это наиболее наглядная демонстрация общности причин и механизмов развития и становления как нормальных, так и патологических функций, связанных с основными регуляторными и защитными системами организма.

Его характеризует ряд особенностей.

- В генной сети, участвующей в онтогенезе репродуктивной системы человека, насчитывается: в женском организме - 1700+39 генов, в мужском организме - 2400+39 генов. Не исключено, что в ближайшие годы вся генная сеть органов репродуктивной системы выйдет по количеству генов на второе место после сети нейроонтогенеза (где 20 тыс. генов).
- Действие отдельных генов и генных комплексов в составе указанной генной сети тесно связано с действием половых гормонов и рецепторов к ним.
- Выделены многочисленные хромосомные нарушения дифференцировки пола, связанные с нерасхождением хромосом в анафазе митоза и профазе мейоза, числовыми и структурными аномалиями гоносом и аутосом (или их мозаичными вариантами).
- Выделены нарушения развития соматического пола, связанные с дефектами образования рецепторов половых гормонов в тканях мишеней и развитием женского фенотипа с мужским кариотипом - синдром полной тестикулярной феминизации (синдром Морриса).
- Выделены генетические причины бесплодия и опубликована их наиболее полная классификация.

Таким образом, в последние годы в исследованиях онтогенеза репродуктивной системы человека произошли существенные перемены и достигнуты успехи, реализация которых, безусловно, позволит усовершенствовать методы лечения и профилактики нарушений репродукции, а также мужского и женского бесплодия.

ГЛАВА 17 ЗДОРОВЬЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГРУЗ И НАСЛЕДСТВЕННАЯ ПАТОЛОГИЯ ПОКАЗАТЕЛИ ЗДОРОВЬЯ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГРУЗ ЧЕЛОВЕКА

Показателями здоровья человека как биологического вида являются: состояние генофонда и репродуктивной функции (см. главы 2 и 16).

Генофонд человека - это совокупность всех его генов (генотипов) в общей популяции, а общая популяция - это совокупность организмов всех людей, населяющих Землю (6,5-7,0 млрд человек). Для генофонда характерны:

- генетическая целостность;
- дифференцированность и неоднородность генотипов при сохраняющейся общей совокупности генов;
- зависимость генофонда современного человека от генофонда предков;
- наличие генетического груза или груза наследственной патологии, объем которого растет параллельно с прогрессом человечества и за всю историю медицины, начиная со времен Гиппократов, достиг 8,5-10,0%.

Генетический груз - это меньшая часть общей популяции, имеющая измененную наследственность, определяющую появление организмов с наследственной патологией, менее приспособленных к выживанию в окружающей среде и поэтому подвергающихся избирательной гибели в ходе естественного отбора.

Наследственная патология включает следующее.

- Генные или моногенные болезни (ГБ или МБ). Их количество достигло 4,5 тыс. нозологий, а частота в популяции составляет 3% или 30 детей на 1000 родившихся. В разных регионах России частота МБ составляет 4,2-6,5%.
- Сложно наследуемые (полигенные) болезни или мультифакториальные заболевания (МФЗ). На их долю приходится 94-96% хронической неинфекционной патологии; частота - 1,5%.
- Хромосомные болезни (ХБ). Их более 100 нозологий + 900 типов хромосомных нарушений; частота - до 1%.
- Врожденные болезни, большие и малые аномалии развития (БАР и МАР); их частота составляет 3%.

В последние годы были расшифрованы генетические причины и механизмы онкологических заболеваний. Поэтому эти болезни стали называть онкогенными (ОГБ) и относить к одной из форм наследственной патологии, причем около 90% ОГБ относятся к классу МФЗ и 10% - к классу МБ (см. главу 25). Частота ОГБ среди населения пожилого и старческого возраста достигает 10%, а среди детского населения - 1 случай на 160 детей (до 1%).

В общий объем генетического груза человека входят также гетерозиготные носители генов, или гетерозиготы. Считается, что в общей популяции количество гетерозигот не менее 3-5%. Гетерозиготы - это практически здоровые люди, в генотипах которых наряду с одной копией нормального аллеля гена присутствует вторая копия патологического аллеля этого же гена, полученная от одного из родителей. «Плохое» для гетерозигот начинается после их вступления в брак, когда речь заходит о прогнозе здоровья потомства. В таких семьях риск развития аутосомно-рецессивных и аутосомно-доминантных болезней составляет 25% и 50% соответственно.

Наиболее известными примерами таких заболеваний служат: АГС, анемия Фанкони, атаксия-телеангиэктазия, ВГ, муковисцидоз, пигментная ксеродерма, прогерия Вернера и Хатчинсона-Гилфорда, ФКУ, хорея Гентингтона и ряд других.

В таблице 11 приведена структура общей заболеваемости населения.

Таблица 11. Структура общей заболеваемости населения

Форма патологии	Частота, %
Генетические болезни, в том числе:	48,9-64,1
МБ	3,9-6,5
МФЗ	38,2-56,6
ХБ	0,8-1,0
ВПР	0,6-10,0
Негенетические болезни	25,4 - 53,2
ВПР	0,8

Основные показатели здоровья населения России в конце XX в. резко ухудшились. Так, средняя продолжительность жизни мужчин

в период с 1990 до 2005 г. уменьшилась на 15-16 лет, составив 74 года (1990) и 58,6 года (2005). Вместе с тем, у женщин продолжительность жизни изменилась мало (74 и 72 года соответственно). При этом рождаемость населения в России в расчете на 1000 человек уменьшилась в 2,5 раза и составила 8,6-10%, а младенческая смертность наоборот выросла до 19,9-23,4% против 9-11,0% в развитых странах. Из общего числа российских детей практически здоровы только 15-18% (каждый шестой ребенок), тогда как дети с хроническими болезнями составляют 32-35% (каждый третий ребенок), а дети с отклонениями физического и умственного развития - 47-53% (каждый второй ребенок). В структуре причин общей заболеваемости и смертности детского населения России значительный удельный вес стали занимать БАР и МАР, которые, например, по такому показателю, как потерянные и ухудшенные годы жизни, выдвинулись на одно из первых мест, оставив позади сердечно-сосудистые, онкологические и другие заболевания.

Неблагоприятная ситуация с генетической патологией у детей наблюдается во всех развитых странах мира, где такие дети постоянно госпитализируются в педиатрические клиники и занимают в них 30-40% коечного фонда, а в специализированных клиниках это каждые две койки из трех. При этом один из 15-ти детей имеет моногенное или врожденное заболевание, а с учетом хромосомных синдромов и МФЗ - это каждый четвертый ребенок (в специализированных стационарах - каждый второй-третий ребенок). Смертность детей в возрасте до 5 лет включительно при МФЗ достигла 35-42%, МБ - 10-14%, ХБ и ВПР - по 2-4%, т.е. генетические причины вызывают гибель 48-60% таких детей (каждый второй-третий из них)*.

ПРИЗНАКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

Разный характер наследования

Известно, что патологический ген или хромосомное нарушение сохраняются у индивида в течение всей жизни. При этом патологический ген - это либо новая генная мутация, либо (что гораздо чаще) мутация, переданная от предыдущих поколений, а хромосомное

* Безусловно, эти данные заслуживают особого внимания, так как именно они являются предвестником приближающейся угрозы для человечества - его депопуляции: пока это только 10% генетического груза, а что будет дальше?

нарушение - это, как правило, новая хромосомная или геномная мутация.

Для МБ характерно менделевское наследование (см. главу 4). В случае МФЗ характерно полигенное наследование, и обуславливающие их развитие генные сети прямо передаются больному потомку как гены, общие с родителями и больными родственниками. При этом количество передаваемых потомку генов зависит от степени родства с предками (общности генов) и их проявление связано с действием факторов внешней среды, т.е. будет наблюдаться суммарный или аддитивный эффект действия генетических и средовых факторов.

Для ВПР характерно наличие или отсутствие наследования. Например, выделяют доминантно и рецессивно наследуемые моногенные пороки, пороки при хромосомных синдромах, пороки мультифакториальной и экзогенной природы.

Для ХБ наследование, как правило, нехарактерно, кроме случаев семейного носительства родителями больного потомка редких сбалансированных (фенотипически не проявляющихся) транслокаций, инверсий и инсерций.

Сегрегация в семейных родословных

Наследственная патология накапливается (сегрегирует) в семейных родословных. При этом сегрегация касается либо самой болезни, либо ее отдельных признаков, что обусловлено наличием генов, общих для потомка и его родителей и родственников. Выделяют семейные формы, характерные для всех без исключения форм наследственной патологии:

- МФБ - бронхиальная астма, гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, психические расстройства, сахарный диабет, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, псориаз и др.;
- МБ - атаксия Мари, атаксия Фридрейха, семейная гиперхолестеринемия, спастический паралич Штрюмпеля, эссенциальный тремор Минора и др.;
- ХБ - носительство редких сбалансированных транслокаций, инверсий и инсерций;
- ВПР - атрезия или стеноз ануса и прямой кишки, болезнь Гиршпрунга, врожденный вывих бедра, гипертрофический пилоростеноз, гипоспадия, симфалангия (отмечена у потомков 14-ти поколений английского полководца Джона Тальбота) и др.

Разное время манифестации и связь с возрастом

Для МБ и МФЗ характерно разное время манифестации, что связано с дифференцированной генной экспрессией, зависящей от типа клеток в составе тканей, периода онтогенеза, механизма взаимодействия отцовских и материнских (по происхождению) аллелей генов, их разной экспрессивности и пенетрантности под действием факторов среды. По данным канадских генетиков, манифестация большинства МБ (90%) и МФЗ (90%) приходится на детский и пожилой возраст соответственно.

В обзорной статье, опубликованной G. Jimenez-Sanchez et al. в журнале Nature в 2001 г., суммированы последние данные о времени манифестации в ходе онтогенеза почти 1000 патологических генов, лежащих в основе МБ. Эти данные отличаются от ранее опубликованных, хотя и в них преобладает детский возраст манифестации. Так,

наибольшее количество МБ (33%) манифестирует у детей; эти болезни обусловлены мутациями белков со специальными функциями (белков терминальной дифференцировки). Мутации в генах, продуцирующих такие белки, обычно проявляются в первые годы жизни. Наличие многих дефектных белков, например, белков при НБО (см. ниже), отмечается уже в неонатальном периоде развития, других - в раннем подростковом периоде, и только некоторые из них появляются у взрослых, например белки при болезнях экспансии числа нуклеотидных повторов (см. главу 28).

Примерно 15% МБ обусловлены мутациями в генах, контролирующих процессинг мРНК, стабильность и функционирование белков процессинга, белков-транспортеров, белков-рецепторов и других белков. Мутации в генах, экспрессирующих эти белки, проявляются позже, и пик их манифестации приходится на подростковый и юношеский возраст. Так, большинство генов рецепторных белков манифестируют в период полового созревания. На третьем месте по частоте проявления находятся МБ, обусловленные мутациями в генах, контролирующих факторы транскрипции, - таких болезней около 10%. Гены болезней этой группы - филогенетически очень древние гены, производящие низкомолекулярные ядерные белки, выполняющие регуляторные функции по отношению к другим генам генотипа: они включают (выключают) и контролируют их работу. В связи с особыми функциями этих генов их белковые продукты могут стать критическими для клетки и организма, способными переключать программу онтогенеза. Например, к таким продуктам относятся белковые

факторы, продуцируемые геном SRY, которые в раннем эмбриогенезе (5-7 нед развития) включают программу, определяющую развитие организма по мужскому типу. Многочисленные примеры нарушений развития по мужскому типу были приведены в главе 16.

Таким образом, почти 60% МБ проявляются в детском возрасте. Манифестация оставшейся части МБ (около 40%) приходится на взрослый возраст. При этом МБ связаны с мутациями в генах, контролирующих синтез рецепторных белков (около 9%), белков внутриклеточного и внеклеточного матрикса (по 5% для каждого типа), белков-переносчиков (5%), гормонов (3%), иммуноглобулинов (2%).

Вместе с тем известны МБ с варьирующим временем манифестации. В частности, тяжелое нейродегенеративное аутосомно-доминантное заболевание с полной пенетрантностью хорея Гентингтона (ХГ) манифестирует в возрасте от 1 года до 75 лет. Причем начало болезни у 20% больных приходится на возраст 41-45 лет, у 77% больных - 31-55 лет. Со временем манифестации ХГ коррелирует ее прогрессивность (например, развитие хореотического гиперкинеза и деменции). Что касается манифестации МФЗ, то в детском возрасте проявляется только 10% этих заболеваний, а основная их часть манифестирует в пожилом возрасте.

В свою очередь, для большинства хромосомных аутосомных синдромов и врожденных аномалий развития характерна манифестация с момента рождения ребенка, тогда как ХБ, связанные с нарушением половых хромосом, проявляются только в период половой зрелости; до этого периода они протекают бессимптомно и поэтому диагностируются случайно при массовых врачебных осмотрах, например, юношей-допризывников или спортсменов.

Множественность поражения

При МБ и ХБ, а также в случае ВПР, в поражение вовлекается не менее двух-трех систем организма, что объясняется плеiotропным действием мутантного гена (в случае МБ),

генным или хромосомным дисбалансом (в случае ХБ и множественных ВПР). Для МФЗ, как правило, характерно поражение одной системы организма.

Прогредиентный или постоянный характер течения МБ и МФЗ

Отличительными чертами большинства МБ и МФЗ являются патокинез (движение) патологического процесса и его прогредиентность (прогрессирование) - см. главу 3.

Согласно И.В. Давыдовскому (1961), при данных болезнях имеет место: наличие латентного бессимптомного периода (продрома), периода появления (манифестации) первых симптомов, периода постепенного нарастания степени их выраженности и тяжести течения болезни. Исход заболевания разный (выздоровление, переход в хроническое течение, летальный исход).

В случае МБ, особенно НБО, в первые двое-трое суток жизни младенца симптоматики нет. Дети, как правило, рождаются внешне здоровыми и после нормально протекавшей беременности. Их состояние ухудшается внезапно по типу нейро-дистресс-синдрома. Ребенок отказывается от кормления, у него появляется и нарастает неврологическая симптоматика, задерживается психомоторное развитие, развиваются гипорефлексия, мышечная гипотония или гипертония, рвота. Могут развиваться судороги, остановка дыхания, кардиомиопатия, сосудистая недостаточность и коллапс (вплоть до клинического синдрома внезапной смерти - см. главу 3), летаргия, кома, почечная недостаточность. Постепенно нарастают дегидратация, ацидоз, кетоз, гипераммониемия. В дальнейшем такой ребенок отстает в физическом развитии.

Указанная симптоматика обусловлена постепенным накоплением в организме токсических продуктов метаболизма до метаболического (ферментативного) блока: кетокислот, метилмалоновой, пропионовой кислот, аммиака и других соединений, а также истощением запасов энергетических субстратов или невозможностью их использования вследствие такого блока.

Конституциональность, врожденность и непрогредиентность ХБ и ВПР

Клиническая картина при ХБ и ВПР остается постоянной с рождения до смерти индивида. Их главные отличительные особенности - это постоянство патологического фенотипа

Большие и малые врожденные аномалии развития

Большие и малые врожденные аномалии развития встречаются при всех формах наследственной патологии в виде отдельных множественных нарушений развития организма. Они могут рассматриваться не только как характерная особенность при разных формах наследственной патологии, но и как самостоятельное направление генетики - тератология (дисморфология).

Полиморфизм признаков

Полиморфизм признаков (разнообразие) характерен для всех форм наследственной патологии. В его основе лежит множество генетических причин (гетерогенность) - см. главу 2. Генетические причины полиморфизма признаков наследственной патологии - это варианты патологической изменчивости наследственного материала: множественный аллелизм и аллельные серии, влияние генов модификаторов, генокопирование, плейотропное действие генов, импринтинг, экспансия нуклеотидных повторов, эффект положения (см. главу 5).

В свою очередь негенетические (экзогенные) причины полиморфизма признаков наследственной патологии - это результат действия факторов окружающей среды при фенотипах или их сочетанное действие с генетическими причинами.

Задержка физического и психомоторного (психического) развития

Задержка физического и психомоторного (психического) развития, олигофрения и выраженная неврологическая симптоматика характерны для большинства МБ и ХБ. При МФЗ и ВПР, как правило, этот признак не наблюдается.

Нарушение полового развития и функции репродукции

Нарушение полового развития и функции репродукции (включая мужское и женское бесплодие) характерно для многих МБ и гоносомных ХБ (см. главу 16). При остальных формах наследственной патологии эти признаки почти не выражены.

Снижение продолжительности жизни и повышенная смертность больных

Снижение продолжительности жизни и повышенная смертность больных характерны для многих форм наследственной патологии.

Резистентность к терапии

Только этиологическая и патогенетическая терапия направлена на полное устранение или блокирование причин и механизмов наследственной патологии (см. главу 30). Поэтому резистентность (невосприимчивость) к терапии наследственной патологии - это результат отсутствия радикальных методов лечения и причина нигилизма врачей и самих больных, считающих такой диагноз «пожизненным приговором». Вместе с тем, в последние годы благодаря внедрению

в молекулярную медицину радикальных методов генотерапии, клеточной и тканевой терапии многих форм наследственных болезней появились надежды на благоприятную перспективу (см. главу 20).

Характеристика молекулярных причин и механизмов наследственной патологии

Концепция о происхождении молекулярных болезней обсуждается в медицине с 80-х годов XIX в. Она предусматривает, что в основе наследственной патологии лежат нарушения физико-химических процессов, затрагивающих структурные и функциональные компоненты клетки в ходе ее метаболизма. Иными словами, молекулярные болезни обусловлены расстройствами действия генов (генотипа), влиянием факторов окружающей среды или тем и другим одновременно. Эти группы причин получили название основных факторов формирования нормальных и патологических признаков и фенотипов (см. главы 2 и 3).

Основные модели для изучения причин и механизмов наследственной патологии

Анализ причин и механизмов формирования признаков и фенотипов наследственной патологии позволяет выделить две особенности.

Первая особенность - эволюция человека «предоставила» три модели для изучения причин и механизмов наследственной патологии:

- модель, основанная на действии только патологических генов, - это МБ, меньшая часть ОГБ (около 10%) и врожденные аномалии развития (0,6-10%), обусловленные генными и хромосомными мутациями;

- модель, основанная на действии только патологических факторов среды (проявляющихся на фоне действия генов), - это экзогенные болезни, обусловленные ненаследственной (модификационной) изменчивостью (см. главу 5), и врожденные аномалии развития экзогенной природы (0,8%);
- модель, основанная на совместном действии патологических генов и факторов среды, - это полигенные (мультифакториальные) болезни, большая часть ОГБ (около 90%), ХБ и врожденные аномалии развития мультифакториальной природы.

Вторая особенность - врожденные аномалии развития и ОГБ можно изучать на основе каждой из указанных моделей в отдельности или сразу всех трех, включая две монофакторные модели (действие

гена, действие фактора среды) и одну многофакторную модель (суммарное действие генов и факторов среды).

Причины и патогенез моногенных болезней

Причины и патогенез МБ связаны с первичными молекулярными нарушениями структуры генов и кодируемых ими белков, нарушениями активации ферментов и метаболическими блоками. При этом экспрессия патологических генов не только ведет к синтезу патологических белков, но и (через промежуточные продукты метаболизма) изменяет физико-химические характеристики и количество белковых и небелковых компонентов клетки. Иными словами, действие патологического гена (белка) ведет к нарушениям обмена веществ в клетке и организме в целом (см. главы 7 и 8).

Подавляющая часть этих нарушений вызвана врожденной недостаточностью ферментов, или ферментопатиями. В основе примерно 75% ферментопатий лежит замена оснований в молекуле ДНК, ведущая к замене одной аминокислоты на другую в полипептиде, что изменяет последовательность аминокислот в структуре активного центра фермента или районе связывания апофермента с коферментом (чаще всего витамином или металлом). В результате выпадает каталитическая функция фермента и развивается метаболический блок, останавливающий ход метаболической реакции.

Вследствие метаболического блока накапливаются промежуточные метаболиты, образование которых предшествует блоку, и развивается дефицит конечных продуктов реакции.

Кроме того, метаболический блок вызывает нарушение транспорта участвующих в реакции химических соединений, которые накапливаются до блока и потому становятся токсичными. Например, при ФКУ в результате дефицита фенилаланингидроксилазы или кофермента-тетрагидробиоптерина в крови и тканях накапливается фенилаланин, который подвергается дезаминированию в фенилпироват, токсически (и необратимо) действующий на нервную ткань.

К токсическому поражению ЦНС ведет другое генетическое заболевание - лейциноз или болезнь с запахом мочи, напоминающим запах кленового сиропа. В этом случае накапливаются кетокислоты - продукты трех алифатических аминокислот: лейцина, изолейцина и валина, что сопряжено с нарушениями биохимических превращений в мозге.

К другим примерам МБ, обусловленных дефицитом конечных продуктов метаболизма (вследствие метаболического блока), относятся: АГС, альбинизм, врожденный гипотиреоз и галактоземия.

Как установлено, ферментопатии могут быть связаны с нарушениями клеточных рецепторов, мембранного транспорта, витаминной недостаточностью и дефицитом микроэлементов. Общее количество ферментопатий огромно (например, у человека не менее 180 ферментов являются металлопротеинами, и для каждого из них имеется свой вариант ферментопатии).

Таким образом, концепция о молекулярных болезнях стала фундаментом в исследованиях этиологии и механизмов патогенеза МБ, что со временем привело к значительным результатам. Бурное развитие геномики и протеомики позволило обосновать, разработать и внедрить в молекулярную медицину наряду с методами «прямой генетики» (путь от признака к гену) методы позиционного клонирования, выделения и изучения первичной структуры генов без предварительного знания их белковых продуктов, т.е. методы «обратной генетики» (путь от гена к признаку). На хромосомах человека картированы свыше 11 тыс. генов (включая 1100 генов наследственных болезней) и установлена их тесная связь с производимыми ими белками (см. главу 3).

Вместе с тем, возможности концепции о молекулярных болезнях оказались недостаточными для расшифровки причин и механизмов патогенеза ряда МБ и других форм наследственной патологии. Эти сложности обусловлены следующими причинами:

- *во-первых*, малоизученными особенностями формирования признаков МБ на протяжении всего многозвеньевого пути от гена к признаку, ибо каждое звено этого пути зависит от дифференцированной экспрессии генов, участвующих в формировании разных тканей, и модифицирующего влияния на экспрессирующие гены других генов генотипа и факторов окружающей среды;

- *во-вторых*, неоднозначным характером связей между мутацией в гене и степенью нарушения активности производимого им белка; такая неоднозначность наблюдается при миодистрофиях Дюшенна и Беккера, обусловленных мутацией одного и того же гена, но эта мутация проявляется у них по-разному: при миодистрофии Дюшенна болезнь развивается в раннем детском возрасте и протекает с глубокой инвалидизацией, а при миодистрофии Беккера - в юношеском возрасте и протекает более доброкачественно, не приводя к инвалидности (в дальнейшем эти различия были объяснены разными точковыми мутациями одного и того же гена по типу аллельной серии);

- *в-третьих*, регистрацией новых феноменов: импринтинга, прионизации, экспансии нуклеотидных повторов и антиципации (см. главы 27-29);

- *в-четвертых*, выделением новых механизмов нетрадиционного варианта наследования генов и признаков, обусловленных разным влиянием материнского и отцовского геномов на развитие митохондриальных болезней, болезней импринтинга и прионных болезней.

Так, при изучении митохондриальных болезней на примере атрофии Лебера выделили механизм наследования, смешанного с материнским (цитоплазматическим), и показали, что эта болезнь может передаваться всем потомкам по материнской линии в случае нарушения функций ферментов, синтезируемых мтДНК. Вместе с тем обнаружилось наличие аутосомно-доминантного и аутосомно-рецессивного типов наследования данного заболевания, связанных с нарушениями структуры и функций ферментов, синтезируемых ядерной ДНК.

Так, при изучении митохондриальных болезней на примере атрофии Лебера выделили механизм наследования, смешанного с материнским (цитоплазматическим), и показали, что эта болезнь может передаваться всем потомкам по материнской линии в случае нарушения функций ферментов, синтезируемых мтДНК. Вместе с тем обнаружилось наличие аутосомно-доминантного и аутосомно-рецессивного типов наследования данного заболевания, связанных с нарушениями структуры и функций ферментов, синтезируемых ядерной ДНК.

В дальнейшем описали три типа мутаций мтДНК (точковые мутации двух типов и крупные делеции) и три механизма патогенеза, связанные с мтДНК, ядерной ДНК или межгеномными сигнальными эффектами (см. главы 8 и 26).

Следовательно, кроме митохондриальных генов, процессы окислительного фосфорилирования (митохондриального дыхания) контролируют ядерные гены, экспрессирующие свыше 70 специфических белков.

Было также показано, что мутации ядерных генов ведут к изменению количества копий мтДНК, что обуславливает развитие феномена деплеции или истощения митохондрий. Причем такие мутации не нарушают наследование генов по моногенному варианту.

Другой пример - исследование механизмов эпигеномной регуляции генной активности. Роль геномной памяти в нетрадиционном наследовании генов и признаков (см. главы 4 и 28) была продемонстрирована на разных моделях (синдромы Ангельмана и Прадера-Вилли - *первая модель*, синдром Беквитта-Видемана - *вторая модель* и др.). Так, из болезней, связанных с геномной памятью, описаны: неонатальный сахарный диабет, синдром скелетной дисплазии с карлико-

востью и синдром Рассела-Сильвера. Всего проявление импринтинга было продемонстрировано для пяти материнских по происхождению хромосом (хромосомы 2, 7, 14, 15 и 16) и четыре отцовских по происхождению хромосом (хромосомы 6, 11, 14 и 15). Кроме того, были объяснены причины и механизмы патогенеза прионных болезней, ранее известных как спонгиозные энцефалопатии, объединенные на основе сходства морфологических дефектов (см. главу 29). Завершая рассмотрение причин и механизмов патогенеза МБ, следует выделить наиболее тяжелые их формы, связанные с НБО:

- хорошо известные НБО, например приведенные выше ферментопатии;
- малоизвестные НБО - болезни клеточных рецепторов, сигнальной трансдукции, каналопатии (нарушения калиевых, кальциевых, натриевых и хлорных ионных каналов в мембранах мышечных, нервных и глиальных клеток) и коллагенопатии (нарушения молекулы коллагена).

Как заключительный пример рассмотрим коллагенопатии, при которых имеет место гетерогенность молекул коллагеновых белков, кодируемых разными генами, расположенными в разных локусах на разных хромосомах. Например, в основе несовершенного остеогенеза лежит экспрессия гена COL1A1 (17q21.31-22), синдрома Эллерса-Данлоса 1,2,4 и 7 типов - экспрессия генов COL1A2 (2q31), 3A1 (7q21), 5A1 и 5A2 (9q34.2-34.3) соответственно, синдромов Стиклера и Книста - COL 11A1 (1p21) и COL2A1 (12q13.11-13.2), аутосомно-рецессивного синдрома Альпорта - COL4A3 (2q36-37), X-сцепленного рецессивного синдрома Альпорта - COL4A5 (Xq22), миопатии Бетлема - COL6A1 (21q22.3), буллезного эпидермолиза - COL7A1 (3p21.3), множественной эпифизарной дисплазии - COL9A1 (6q13). Безусловно, объединение болезней в отдельные группы облегчает решение вопроса индивидуальной терапии у больных с разными коллагенопатиями, однако такой подход несовершенен, ибо одна и та же нозология входит в разные классы болезней, например миопатия Бетлема и буллезный эпидермолиз, как правило, рассматриваются в группах нервных (нервно-мышечных) и кожных болезней соответственно.

Причины и патогенез мультифакториальных заболеваний

В исследованиях причин и механизмов патогенеза МФЗ, как и в случае МБ, произошли большие изменения. Была доказана роль

генетических причин и механизмов в развитии таких болезней, как атеросклероз, артериальная гипертония, бронхиальная астма (БА), сахарный диабет, шизофрения и другие аффективные состояния, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки (ЯБЖиДК), многие формы рака. Этиология и патогенез этих и других МФЗ стали широко

изучаться с помощью анализа их сцепления с генами-кандидатами и ассоциации с полиморфными генетическими маркерами (см. главу 19).

Понятия «сцепление» и «ассоциация» следует разграничить. Сцепление относится к двум генам, расположенным в одной хромосоме на определенном расстоянии друг от друга, например, ген-кандидат в гены болезни сцеплен с другим геном (локусом). Ассоциация - это самая высокая частота гена-маркера, выявляемого при МФЗ. Она не подразумевает, что ген болезни и маркерный ген расположены в одной хромосоме. Например, с HLA-локусами, расположенными в хромосоме 6, могут быть сцеплены гены разных МБ, находящиеся на разном расстоянии от HLA-комплекса (АГС, гемохроматоз, СЦА). При этом нет оснований считать, что эти заболевания и HLA-комплекс как-то связаны между собой физиологически. С другой стороны, заболевания, ассоциирующиеся с аллелями HLA-комплекса, обычно не являются моногенными, а имеют мультифакториальную природу. К таким заболеваниям относятся аутоиммунные или иммунноассоциированные болезни: болезнь Аддисона, детская спру, миастения гравис, множественный склероз, ревматоидный артрит, сахарный диабет I типа, тиреотоксикоз и хронический гепатит. Показанные для них ассоциации касаются D/DR-антигенов HLA-системы. Причем семейные исследования выявили их сегрегацию у родственников пробандов, хотя отсутствовало менделевское наследование. Тем самым D/DR-гены HLA-комплекса и гены аутоиммунных заболеваний, будучи ассоциированными, не являются сцепленными. Вместе с тем, слабую ассоциацию со многими МФЗ показали группы крови системы ABO, и наоборот, сильную ассоциацию с МФЗ показали антигены системы HLA. Описана также ассоциация полиморфизма альфа-1-антитрипсина с хронической эмфиземой легких у взрослых, патогенез которой обусловлен генетической гетерогенностью или серией множественных аллелей локуса PI (23 разных фенотипа), которые способны индуцировать механизмы разрушения легочной ткани при хронической эмфиземе легких в результате инфицирования. МФЗ нередко называют болезнями с наследственной предрасположенностью, имея в виду преобладание в их патогенезе генетических причин. Наследственная предрасположенность зависит от формирования комбинаций аллелей разных патологических генов - это генные сети, которые вносят общий суммарный (аддитивный) вклад в проявление признаков болезни, включающий вклад каждого отдельного гена (см. главу 22).

Важную роль в развитии МФЗ играют главные гены, от которых зависит инициация болезни и которые выступают координаторами действия всех ее генов.

Кроме того, при МФЗ выделены ассоциации с моногенно наследуемыми формами наследственной патологии. Например, у каждого второго больного с гиперлипидемией, приводящей к ишемической болезни сердца (ИБС), определяется моногенно наследуемая форма семейной гиперхолестеринемии, обусловленная мутациями в гене рецептора ЛПНП - LDLR (19p13.2-p31.1) или диагностируется семейный дефект гена Apo-B-100 (2p23-24).

Наибольшее число моногенно наследуемых форм выделено при инсулинзависимом сахарном диабете I типа; в их число входят первоначально изученные 6 форм: MODY1 (ген NHF4A), MODY2 (ген глюкокиназы или ген GCK), MODY3 (ген ядерного фактора гепатоцитов), MODY4 (ген фактора-1 промотора инсулина), MODY5 (ген печеночного фактора транскрипции 2), MODY6 (ген NEURODY) - см. главу 21.

В свою очередь, моногенно наследуемые формы выделены при эссенциальной гипертензии (ЭГ), развивающейся в результате неравного кроссинговера между генами альдостерон-синтазы и 11-бета-гидроксилазы. Например, идентифицированы четыре моногенные формы, в том числе редкая, купируемая глюкокортикоидами форма - синдром Лиддла или синдром псевдоальдостеронизма (гены эпителиального натриевого канала:

SCNN2 и SCNN3), синдром Гордона , тип 2, или синдром псевдогипоальдостеронизма (ген не локализован), а также синдром избытка минералокортикоидов (ген почечной 11-бета-гидроксистероид-дегидрогеназы).

Следует отметить, что основные клинические проявления ЭГ - это тяжелые осложнения (инсульты, инфаркты, почечная недостаточность). В настоящее время локализовано около 100 генов, продукты экспрессии которых участвуют в развитии этих тяжелых проявлений. К таким продуктам относятся:

- компоненты ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем;
- вещества, обеспечивающие поддержание сосудистого тонуса (компоненты кальциевых каналов, синтазы закиси азота, эндотелины) и целостность структуры сосудов (коллагенсвязывающий белок, фибриллин, эластин);
- рецепторы адренергической системы, например рецепторы дофамина;
- продукты метаболизма стероидных гормонов (11-бета- и 17-альфа-гидроксилазы);
- продукты водно-солевого гомеостаза (аквопорины, рецепторы вазопрессинов);
- ионные каналы.

Вместе с тем, основными генами-кандидатами ЭГ считаются 9 генов, включая два гена, кодирующих субъединицы эпителиального Na^+ -канала, или гены SCNN 1B и SCNN 1G, локализованные в сегменте 16p13-p12; ген APNH или ген антипортера Na^+ / H^+ (1p36.1-p35); ген REN или ренина (1q25-q32); ген AGT или ангиотензина I (1q42-q43); ген ACE или ангиотензин I-конвертирующего фермента (17q22-q24); ген PLA2 или панкреатической фосфолипазы A2 (12q23-q24.1); ген SLC11 или ген гипертензии, связанный с геном, экспрессирующимся в почке (16p13.11); ген NOS3 или ген эндотелиальной синтазы закиси азота (7q35-q36).

Кроме того, показано, что ряд генов, формирующих предрасположенность к ЭГ, вносят вклад в этиологию атеросклероза, что свидетельствует об общности патогенетических механизмов этих заболеваний, обусловленных нарушениями функционирования ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем.

Однако ведущая роль в патогенезе атеросклероза принадлежит повышению концентрации липидов в плазме крови, нарушению процессов свертывания крови и целостности сосудистой стенки. Поэтому в качестве основных генов-кандидатов атеросклероза рассматриваются гены, продукты которых обеспечивают липидный обмен. Эти гены расположены на хромосоме 16 в локусе CETP, кодирующем транспортный белок эфиров холестерина, и в кластере генов apoA1/apoC3/apoA4 на хромосоме 11.

При другом широко распространенном МФЗ - БА - также наблюдается значительное число локусов, сцепленных с этим заболеванием. Продукты экспрессии генов-кандидатов БА, патологические белки

и другие компоненты участвуют в трех звеньях патогенеза болезни: иммунологическом, воспалительном и нейрогенном. При этом особая роль принадлежит генам семейства интерлейкинов, цитокинов и цитокиновых рецепторов (см. главу 8), обеспечивающих нормальное функционирование слизистых оболочек бронхов и тучных клеток, контролирующих уровень IgE в крови и детоксикацию ксенобиотиков.

С учетом этих особенностей большое значение придается выявлению ассоциаций БА с HLA-комплексом (см. главу 15). Наиболее вероятными кандидатами на роль главных

генов предрасположенности к БА считаются гены интерлейкина-9 и интерлейкина-4, картированные на хромосоме 5q31-q33. Вместе с тем, в случае БА у детей, сопровождающейся высокой концентрацией в крови IgE, была обнаружена достоверно значимая ассоциация с локусом короткого плеча хромосомы 20 (20p13), в котором локализован ген мембранассоциированного белка клеточного сурфактанта из семейства цитокиновых рецепторов.

Кроме этих двух генов в формировании предрасположенности к БА важную роль играют еще ряд генов, расположенных в разных хромосомах: ген TNFA (6p21.3-p21.1), гены IGEL и FCER1b (11q12-q13), гены IDIF и NOSI (12q15-q24.1) и ген ESD (13q14.2-q14.3). Их продуктами являются разные белки-ферменты: бета-фактор некроза опухолей, белок-регулятор уровня общего IgE, альфа-иммуноглобулиновый рецептор тучных клеток, гамма-интерферон, нервальная синтетаза окиси азота и эстераза D.

Следует также отметить, что при исследовании причин и механизмов патогенеза МФЗ выявлен ряд генов, сцепленных с остеопорозом, ожирением, рассеянным склерозом, ревматоидным артритом, эндометриозом и другими болезнями с наследственной предрасположенностью.

Причины и патогенез хромосомных болезней

Говоря о причинах и механизмах патогенеза ХБ, следует указать на прямую связь наблюдаемых при них признаков с нарушениями количества наследственного материала в случае хромосомных и геномных мутаций. Иными словами, в основе признаков ХБ лежит хромосомный (и генный) дисбаланс, нарушающий координированную экспрессию генов и приводящий к молекулярным нарушениям. Результаты исследований указывают на особую роль в этих наруше-

ниях общеклеточных генов, к которым относятся структурные гены (кодируют белки, различные типы РНК и другие макромолекулы клетки), и регуляторных генов. Например, ген, находящийся на одной хромосоме, регулирует гены другой хромосомы. Проследим это на примере синдрома Дауна, при котором хромосомная перестройка приводит к дисбалансу как структурных, так и регуляторных генов. В частности, если в хромосоме 21 при трисомной форме синдрома Дауна содержится регуляторный ген, функция которого состоит не в активации, а в умеренной репрессии других генов, то можно полагать, что из-за тройной дозы гена эта репрессия превратится в более жесткую, что приведет к инактивации других генов или к извращению их функции.

Далее представим себе, что дисбаланс структурных генов и регуляторных участков касается нескольких десятков генных локусов. Этого уже будет достаточно, чтобы вызвать глубокие изменения в клеточных системах, в том числе нарушения координации взаимодействия генов, конечным следствием которых будут грубые нарушения процессов развития. Следует заметить: эффект дозы гена может и не иметь значения в патогенезе анеуплоидии, что было показано на примере фермента - супероксиддисмутазы-I при синдроме Дауна (см. главу 11). Вполне вероятно, в основе патогенеза анеуплоидии могут лежать другие события, например эффект положения гена (см. главу 5). Так, при сбалансированных транслокациях количество наследственного материала не меняется, но часто наблюдаются фенотипические нарушения развития (дисплазия и УО), которые можно объяснить с помощью такого эффекта. При этом гены, расположенные вблизи точки разрыва хромосомы, изменяют свое проявление (как правило, ослабевает их доминирование). Если эффект положения касается действия плейотропного гена, то становится весьма вероятным одновременное развитие многих нарушений в разных системах организма.

С другой стороны, эффект положения гена зависит от генотипической среды (генного окружения). Это означает, что в одном генном окружении функции генов, оказавшихся вблизи точки разрыва в хромосоме, могут быть изменены, тогда как в другом генном окружении они сохраняются. Возможно, именно этим объясняется явление, когда родители - носители сбалансированных хромосомных перестроек - являются фенотипически здоровыми людьми, а некоторые их дети (но не все) имеют ВПР.

Также интересно рассмотреть зависимость продолжительности жизни больного с ХБ от типа имеющегося у него хромосомного нарушения. Большинство носителей аутосомных трисомий умирают в первые дни жизни. У больных с трисомиями по половым хромосомам жизнеспособность практически не снижена, и патологический фенотип у них проявляется в период полового созревания, когда начинают функционировать гены, определяющие такое развитие и формирование вторичных половых признаков.

Следует указать на возможную связь развития ХБ плода и новорожденного и эндогенного влияния материнского организма. Приведем два примера. *Первый пример* - это связь возраста материнского организма и частоты проявления полных аутосомных трисомий, в частности частоты синдрома Дауна. Известно, что частота рождения ребенка с болезнью Дауна в оптимальные для материнского организма сроки деторождения (возраст с 19 до 35 лет) соответствует популяционному значению - 1 случай на 600-650 родов. Если возраст матери 36-40 лет, то частота рождения больного ребенка увеличивается в 2 раза (1 случай на 300 родов); при возрасте 41-45 лет - в 6 раз (1 случай на 100 родов); при возрасте 46-50 лет - в 12-13 раз (1 случай на 50 родов). *Второй пример* связан с повышением частоты хромосомных нарушений при гиповитаминозах В₆ и В₁₂, недостатке фолиевой кислоты и некоторых аутоиммунных заболеваниях у родителей и их детей.

Дополнительным аргументом служит упоминавшийся выше пример эндогенного влияния семейной предрасположенности на частоту сбалансированных транслокаций хромосом. Вполне вероятно, что рождение молодой матерью (до 19 лет) ребенка с синдромом Шерешевского-Тернера (кариотип: 45,ХО) обусловлено расширением спектра и разнообразия мутагенов внешней среды, особенно в условиях больших городов, - это «экологическая модель» и связь уже экзогенного влияния факторов среды на повторное возникновение гамет с числовым дисбалансом хромосом, что находит свое подтверждение в исследованиях по экспериментальной генетике.

Причины и патогенез врожденных аномалий развития

В этой области знаний почти ничего не изменилось с тех пор, как в 1973 г. J.C. Wilson впервые систематизировал причины и клеточные механизмы тератогенеза. Среди них были: генные мутации,

хромосомные aberrации, нарушение митоза, нарушение функции нуклеиновых кислот, отсутствие субстратов для биосинтеза белков, нарушение энергетических процессов, ингибция энзимов, изменение осмотического и внутриклеточного давления, нарушение мембранных характеристик. Было отмечено, что патогенез ВПР на уровне тканей характеризуется клеточной гибелью, замедлением распада и рассасывания клеток, отмирающих в ходе нормального эмбриогенеза, нарушением адгезии тканей, митотическими задержками, нарушением дифференцировки клеток, сосудистой недостаточностью, торможением клеточной миграции.

Как и ранее, выделяют два класса причин, обуславливающих развитие врожденных аномалий.

- Класс эндогенных причин - это изменения наследственных структур (мутации), эндокринные болезни и метаболические дефекты, «перезревание» половых клеток и возраст родителей.
- Класс экзогенных причин и три группы факторов: а) физические факторы - это ионизирующая радиация и механическое воздействие (травма, сдавление); б) химические факторы - это лекарственные препараты, химические вещества, применяемые в быту и промышленности, гипоксия; в) биологические факторы - это вакцины, сыворотки, гормоны, препараты гистаминового ряда, вирусы и протозойные инфекции. Большинство тератологов полагают, что одной из наиболее частых причин ВПР служат мутации. В случае точковых мутаций аномалии развития наследуются доминантно (например, брахидактилия, габсбургская губа, хондродистрофия) или рецессивно (например, альбинизм). В случае хромосомных и геномных мутаций - это комплексы множественных ВПР.

Следует отметить: гормональные и метаболические нарушения у беременных нередко приводят к самопроизвольным абортам в результате нарушений дифференцировки клеток, тканей и органов плода (тератогенные синдромы), что существенно влияет на антенатальную и раннюю детскую смертность.

Тератогенный эффект был показан при вирулизирующих опухолях, врожденном гипотиреозе, галактоземии, гистидинемии, сахарном диабете I типа и ФКУ, выявляемых у беременных. Например, диабетическая эмбриопатия проявляется аномалиями развития у новорожденных (37% - пороки костно-мышечной системы, 24% - пороки сердца и сосудов, 14% - пороки ЦНС).

Специфическим нарушением развития является синдром диабетической эмбриоили фетопатии (синдром каудальной дисплазии) у плода и новорожденного в виде аплазии или гипоплазии крестца и копчика, поясничных позвонков и бедренных костей. Этот синдром также проявляется большой массой тела при рождении (отложение жировой клетчатки), гиперплазией поджелудочной железы, жировой дистрофией печени, ангиопатиями и ретинопатиями.

Другой пример - фенилаланиновая фетопатия, которая проявляется у детей, рожденных от матерей, страдающих ФКУ или являющихся гетерозиготными носителями гена ФКУ (см. главу 21).

«Перезревание гамет» как причина аномалий развития признается многими врачами-генетиками. Под этим термином подразумеваются изменения в гаметах, произошедшие в период времени от момента их полного созревания до момента оплодотворения. Чем длиннее это время, тем ниже способность к физиологическому оплодотворению гамет и больше аномальных абортусов и плодов. По-видимому, в основе «перезревания» лежит десинхронизация процессов овуляции и оплодотворения, связанная как с интрафолликулярными причинами (например, гормональные расстройства в преклимактерическом периоде), так и с экстрафолликулярными причинами (например, плохая проходимость маточных труб, приводящая к задержке продвижения по ним яйцеклетки и сперматозоидов навстречу друг другу, или недостаточная подвижность самих гамет). Предполагается также, что результатом «перезревания» является нерасхождение хромосом, проявляющееся анеуплоидией.

Широко известна связь между возрастом матери и наличием пороков развития у детей (см. выше). Также установлена связь возраста отцов с частотой рождения детей с расщелинами губы и нёба, ахондроплазией и комплексами множественных ВПР. По-

видимому, здесь также имеет значение увеличение частоты мутаций в сперматозоидах и их «перезревание».

Нередкими причинами врожденных аномалий являются ионизирующая радиация, воздействие химических соединений и лекарственных препаратов, среди которых: анальгетики, анестетики, антибиотики (стрептомицин, тетрациклин), гемотерапевтические препараты (антикоагулянты, включая варфариновый ряд), наркотические вещества (изотретиноин, кокаин, комазин), противоопухолевые препараты, цитостатики (дипин), противосудорожные агенты (вальпроат, карбамазепин, триметадон, фенитоин, фенобарбитал),

стероидные гормоны, транквилизаторы (талидомид), а также алкоголь. В частности, при хроническом алкоголизме у беременной рождаются дети с синдромом алкогольной фетопатии (врожденная гипоплазия, постнатальный дефицит массы и длины тела, задержка физического и психомоторного развития, микроили гидроцефалия, черепно-лицевые аномалии).

Выделена форма эмбриопатий, связанная с метаболизмом металлов. Например, цинкзависимая эмбриопатия развивается при безмясной диете или при связывании цинка лекарственными препаратами (ацетазоамин, салицилаты), а также при нарушении адсорбции цинка (при хронических колитах). Такая патология проявляется умеренной гидроцефалией, микроили анофтальмией, расщелиной нёба, искривлением позвоночника, грыжами, пороками сердца.

Наконец, следует отметить гипоксию как одну из причин дефектов развития эмбриона и плода. Так, гипоксия в преимплантационном периоде ведет к гибели зародышей, в период органогенеза тормозит его имплантацию и развитие, ведет к порокам развития или гибели плода. Часто гипоксии способствуют анемии и маточные кровотечения у беременных женщин, наличие у них некомпенсированных пороков сердца.

К биологическим тератогенам относятся: вирусы герпеса, ветряной оспы, гриппа, инфекционного гепатита, краснухи, цитомегалии, эпидемического паротита, полиомиелита, СПИДа; возбудители протозойных инфекций (токсоплазмоз, сифилис); половые стероиды.

Таким образом, можно заключить: если со знанием причин врожденных аномалий развития дело обстоит в основном благополучно, то механизмы их формирования по-прежнему объясняются только общими нарушениями внутриутробного развития организма, которые представляются тератологами как нарушения одного или сразу нескольких процессов (гаметогенез, оплодотворение, имплантация зародыша в матке, его морфогенез и гистогенез в эмбриональном и фетальном периодах, рождение и раннее постнатальное развитие).

Однако практически не изучены молекулярные механизмы этих нарушений развития на уровне экспрессии патологических генов и модификации патологических белков, хотя в последние годы получены определенные результаты, указывающие на то, что такого рода нарушения обусловлены мутациями в генах раннего развития, контролирующих белковые факторы транскрипции (см. главы 8 и 12).

Больше внимание стало уделяться механизму плеiotропного действия генов в случае наследственных синдромов, сопровождающихся комплексами множественных ВПР (см. главу 5). В частности, выделены два варианта плеiotропии: относительная и мозаичная.

В случае *относительной плеiotропии* нарушения развития могут быть связаны с общей причиной, например с дефектами структуры коллагена - белка соединительной ткани.

Показано: именно этот дефект лежит в основе подвывиха хрусталика, скелетных и сердечнососудистых аномалий при синдроме Марфана.

В случае *мозаичной плейотропии* нарушения развития также объясняются общей причиной - действием одного патологического фактора (или группы аддитивно действующих факторов) в разные периоды времени и на разных стадиях развития. Например, при синдроме Эллиса-ван-Кревельда так объясняется формирование врожденного порока сердца, полидактилии, скелетной дисплазии (дефект соединительной ткани) и множественных уздечек в ротовой полости.

Причины и патогенез онкогенных болезней

В настоящее время окончательно доказана ключевая роль повреждений молекулы ДНК в развитии опухолевого процесса. Об этом свидетельствуют многочисленные данные, наиболее значимые из которых следующие:

- идентификация большого количества генных мутаций и хромосомных перестроек (делеции, инсерции, транслокации) в опухолевых тканях и культивируемых *in vitro* раковых клетках, что проявляется нестабильностью их генома и считается общим свойством опухолевых клеток;
- выделение наследственных форм рака;
- онкогенное влияние некоторых вирусов, способных к взаимодействию с геномом клеток хозяина и встраиванию в молекулу

ДНК;

- практически полное соответствие между физическими и химическими мутагенами и онкогенами по мутагенному и канцерогенному эффектам.

Однако до понимания истинных причин и механизмов канцерогенеза пока довольно далеко: молекулярные закономерности функционирования генома раковой клетки еще слабо изучены. И хотя известно, что опухолевые клетки - это активно делящиеся клетки, не контролируемые внешними регуляторными сигналами, до сих пор

не определены свойства тканеспецифической регуляции экспрессии генов, обуславливающих не только развитие многоступенчатого процесса озлокачествления, но и работу нормальных генов, по каким-то причинам уступающих пролиферативное преимущество раковым клеткам. При этом речь идет о следующих изменениях: частичная или полная утрата нормальными клетками способностей к пролиферации и дифференцировке; иммортализация (неограниченный во времени клеточный рост или продление времени жизни раковой клетки и увеличения числа ее делений)*; способность клетки к росту без прикрепления к субстрату; снижение уровня восприимчивости к клеточным факторам роста, находящимся в плазме крови; потеря механизма контактного ингибирования; исчезновение ряда поверхностных макромолекул (включая рецепторы). Все эти изменения «делают» злокачественные клетки менее уязвимыми для действия иммунной системы организма.

Известно, что в ходе эволюции были выработаны мощные механизмы, направленные на сохранение генетической стабильности клетки и организма и поддержание равновесия между действием двух систем регуляции клеточного деления: позитивных и негативных генов. В настоящее время постоянно увеличивается количество картированных и клонированных генов, вовлеченных в процесс озлокачествления. Нарушение равновесия

между позитивными и негативными генами лежит в основе молекулярных реакций, запускающих механизмы канцерогенеза.

В этой связи следует выделить две группы пусковых причин:

- первая группа - это нарушение взаимодействия генов, регулирующих клеточный цикл;
- вторая группа - это мутации в онкогенах, принадлежащих к двум разным семействам, контролирующим процессы жизнеобеспечения клетки: протоонкогенам, вызывающим опухолевый рост, и антионкогенам (или генам-супрессорам опухолевого роста).

Нарушение взаимодействия генов, регулирующих клеточный цикл

Процесс озлокачествления нормальной соматической клетки связан с накоплением мутаций в ее геноме. Особое место в этиологии опухоли занимает комплексное повреждение генов, контролирующих клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз.

* Термин «иммортализация» приведен из словаря терминов по стволовым клеткам (<http://www.kletca.ru/stem-cells/glossary>).

Приведем пример накопления мутаций в геноме соматической клетки: рассмотрим наиболее часто повреждаемый локус короткого плеча хромосомы 9 (9p21), в котором находятся гены, кодирующие негомологичные ядерные белки: p16INK4a, p15INK4b и p14/ARF. Эти белки появляются в ходе транскрипции как результат альтернативных рамок считывания и выполняют в клетке супрессорные функции. Особую роль играет белок p16INK4a, связывающий циклинзависимые киназы Cdk4 и Cdk6 и препятствующий образованию комплексов с циклинами D, которые фосфорилируют ген RB1 (или ген ретинобластомы). Этот ген находится в комплексе с белком, являющимся его собственным продуктом. При распаде комплекса освобождается фактор транскрипции E2F. Действие гена RB1 тесно связано с функционированием генов, относящихся к генам-супрессорам опухолевого роста и протоонкогенам, продукты которых влияют на активность как самого гена RB1, так и клеточных генов (в результате освобождения фактора E2F), чем инициируется переход клетки в S-фазу клеточного цикла. Активность ядерных белков p16INK4a и p14/ARF в нормальных клетках в ходе экспрессии протоонкогенов Мус, Ras, Raf предотвращает дальнейшее размножение тех клеток, в которых произошла активация одного из онкогенов. Такое действие объясняется наличием в локусе CDKN2A/ARF участков связывания с фактором транскрипции E2F, который может активироваться многими онкогенами. Способом негативной регуляции активности гена RB1 служит механизм инактивации циклинзависимых киназ с помощью белка p16INK4a.

На рис. 59 приведена схема взаимодействия этого гена, других генов и их генных продуктов в процессе канцерогенеза. Ядерный белок p14/ARF способен стабилизировать и активировать ген-супрессор p53 в ходе экспрессии некоторых вирусных и клеточных онкогенов. При этом совместное функционирование гена-супрессора p53 и гена RB1 регулирует процесс апоптоза (см. главу 11). Подтверждением этому служат мутации, идентифицированные в разных злокачественных опухолях (глиобластома, наследственные спорадические меланомы, острый лимфолейкоз, рак мочевого пузыря, пищевода и поджелудочной железы), а также процесс метилирования локуса CDKN2A/ARF. Именно эти события вызывают инактивацию одного из трех белковых продуктов данного локуса: p16, p15 или pARF.

Следует выделить другой путь сигнализации или влияния на активность гена RB1 через клеточный протоонкоген Ras, который

играет центральную роль в передаче внутриклеточного митогенного сигнала. В этом случае ген Ras запускает киназный каскад: Raf - Mek - Erk, обеспечивающий передачу сигнала пролиферации от мембраны в ядро клетки и распределяющий сигнальные импульсы по отдельным путям через эффекторные белки. Например, мишенью для Ras-белка служит ген Raf, стимулирующий MAP-киназы, или митоген-активные белки, участвующие в каскаде запуска циклин-зависимых протеинкиназ, необходимых для фосфорилирования гена RB1 и фосфатидил-инозитол-3'-киназы (PI3K).

Еще один механизм, но уже опосредованно влияющий на функционирование системы CDK-RB1, - вовлечение гена-супрессора APC. В этом случае фактором транскрипции служит белок бета-катенин, активность которого регулируется путем связывания с трансмембранным гликопротеидом или E-кадгерином, который участвует в образовании межклеточных контактов.

Инактивация гена APC или мутация в гене бета-кадгерина (CTBN1) уменьшают связывание последнего с E-кадгерином, стимулируя образование комплекса: бета-катенин Tcf4. Мишенью для этого комплекса являются ген циклина D1 и протоонкоген Мус. В результате активируются циклин-зависимые киназы (комплексы

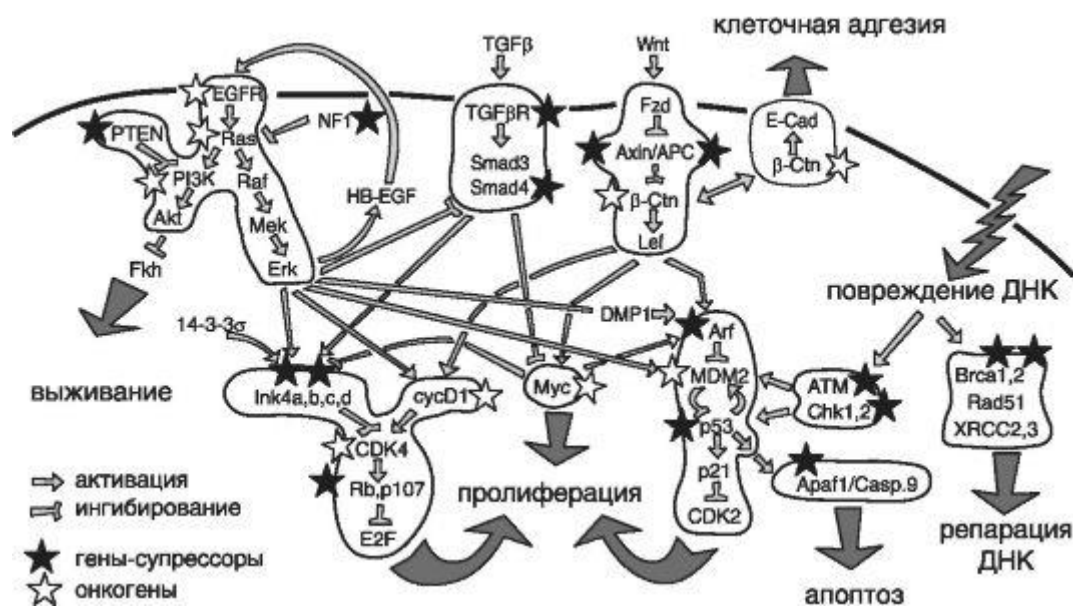


Рис.

59. Схема взаимодействия генов в процессе канцерогенеза (по Залетаеву Д.В. и соавт., 2005)

циклин D/cdk4,6 и циклин E/cdk2) и происходит фосфорилирование гена RB1, обуславливающее переход клетки в S-фазу.

Например, мутации в генах CDH1 (Е-кадгерин), бета-катенина и APC были обнаружены в наследственных и спорадических опухолях желудочно-кишечного тракта, спорадических опухолях грудной железы и яичников. Предполагается, что онкогенный эффект мутаций гена Е-кадгерина связан с разобщением межклеточных сигналов, активирующих ген p53.

Кроме того, был выделен еще один путь регуляции клеточной дифференцировки: через взаимодействие клеточных матриц между собой с помощью фактора роста TCF-бета и белков семейства Smad. В этом случае цитокин TCF-бета участвует в регуляции пролиферации нормальных эпителиальных, эндотелиальных и гемопоэтических клеток. В ходе такой регуляции активируются, например, рецепторы гемопоэтических клеток и фосфорилируются специфические сигнальные молекулы - белки Smad 2 и Smad 3, что вызывает их связывание с фактором транскрипции Smad 4. Образующиеся при этом

комплексы переносятся из цитоплазмы в ядро клетки и там регулируют транскрипцию генов-индукторов циклинзависимых киназ p21/waf1, p15/cdkn2a и p21/kip1. При активации этих генов блокируется фосфорилирование гена RB1 и происходит задержка перехода клетки из фазы G₀ в фазу G₁ клеточного цикла. Этот путь характерен для развития рака желчного пузыря, легких, поджелудочной железы и толстого кишечника.

Мутации в клеточных онкогенах

Протоонкогены

Идентифицировано свыше 100 протоонкогенов. Они считаются позитивными регуляторами клеточного роста: способны к индукции деления клетки и представляют собой группу генных семейств, играющих ключевую роль в пролиферации и дифференцировке клетки, функционировании ее рецепторов, репарации клеточной ДНК и формировании ответа клетки на внешние регуляторные воздействия. Продукты экспрессии протоонкогенов регулируют сигнальную трансдукцию, опосредованную механизмами:

- фосфорилирования серина, треонина и тирозина, содержащихся в остатках белков (при их деградации) путем отщепления фосфатной группы от АТР, что изменяет конфигурацию белков-ферментов и их активность;
- регуляции активности GTPазы, осуществляющей превращение GDP в GTP, играющего роль молекулярного медиатора для мембраноассоциированных тирозин-киназы и серин-треонинкиназы;
- регуляции репликации ДНК, экспрессии ядерных генов и апоптоза. Следует отметить, что значительная часть протоонкогенов была идентифицирована по их гомологии с вирусными онкогенами. Канцерогенный эффект протоонкогенов проявляется при наличии активирующей мутации в гетерозиготном состоянии.

Гены-супрессоры опухолевого роста

Гены-супрессоры опухолевого роста выступают как негативные регуляторы клеточной пролиферации и дифференцировки, препятствующие делению клетки. В нормальном состоянии они тормозят экспрессию протоонкогенов. Поэтому их иногда называют антионкогенами (по аналогии с антимутагенами - см. главу 5).

Канцерогенный эффект генов-супрессоров проявляется в гомозиготном состоянии активирующей их мутации (в отличие от доминантного эффекта мутации в гетерозиготном состоянии у протоонкогенов).

В настоящее время изучено 20 генов-супрессоров, включая:

- ген RB1 (13q14) или ген ретинобластомы; он связан с развитием остеосаркомы, рака грудной железы, легких, мочевого пузыря и простаты;
- ген WT1 (11p13), ген опухоли Вилмса (аниридия и аномалии развития мочеполовой системы), ген нефробластомы;
- ген опухолевого белка (tumor protein) - TP53 или p53 (17p13.1), или общий ген, встречающийся при раке самых разных локализаций; его также называют геном синдрома Ли Фрамени, связанным с развитием опухолей любых тканей и внутренних органов (карцинома почек, остеосаркома, рабдомиосаркома, рак коры надпочечников, мозга, молочной железы, мочевого пузыря, поджелудочной железы, прямой кишки, лейкомия);

- ген VHL (3p25[^]26) или ген синдрома фон Хиппеля-Линдау; связан с гемангиобластомой, феохромоцитомой, почечно-клеточной карциномой и раком поджелудочной железы;
- ген BRCA, тип 1 (17q21), ген семейного рака грудной железы и яичников;
- ген BRCA, тип 2 (13q12-13), ген наследуемых (несемейных) форм рака грудной железы и яичников;
- ген APC (5q21), ген семейного аденоматозного полипоза (синдром Гарднера); связан со злокачественными опухолями желудка, поджелудочной железы, прямой кишки;
- гены NF-1 (17q12-22) и NF-2 (22q) или гены нейрофиброматоза, типы 1 и 2 (болезнь Реклингхаузена); связаны со шванномами и менингиомами центральной или периферической нервной системы;
- ген p16 (9p21), ген мезотелиомы, глиобластомы и семейной меланомы;
- ген MEN-1(11q) или синдрома множественной эндокринной неоплазии;
- ген рецептора тирозинкиназы, ген RET (10q21), ген синдрома множественной эндокринной неоплазии (типы MEN-2А и MEN- 2В); связан с медулярным (папиллярным) раком щитовидной железы и феохромоцитомой;
- ген PTEN (10q23.3), ген синдромов Банаяна-Зонана, Ковдена и Райли-Рувалка; связан с глиобластомами, неходжкинскими лимфомами, раком грудной, щитовидной и предстательной желез, раком эндометрия и яичников;
- гены Mut S или MSH2 (2p15-22) и Mut L MLH1 (3p21.3), гены наследственного неполипозного рака толстой кишки;
- ген CDH1 (16q22.1), ген рака желудка;
- гены TSC1 (9q34) и TSC2 (16p13.3), гены туберозного склероза; связаны с гемартромами мозга, глаз, кожи, почек, легких, сердца и костей.

Важно отметить, что как сами протоонкогены и гены-супрессоры, так и механизмы канцерогенеза, запускаемые с их участием, имеют существенные различия. В частности, мутации в протоонкогенах, обуславливающие их трансформацию в клеточные (целлюлярные) онкогены (с-онс), могут, с одной стороны, затронуть структурную часть гена и вызвать изменение его конечного продукта. В этом случае мутации изменяют конфигурацию белка, что активирует его аутофосфорилирование, увеличивает ферментативную активность, рост клетки.

Первый пример - это аутосомно-доминантные мутации, не нуждающиеся во второй аллельной копии онкогена для инициации злокачественной трансформации. К ним относятся мутации прото-

онкогенов семейства *ras*, например мутация кодона гена *c-Ha-ras* при карциноме мочевого пузыря. В этом случае в ДНК происходит замена гуанина на тимин, а в белке - замена глицина на валин. *Второй пример* - это точковая мутация гена *c-N-ras* при меланоме (замена лизина на глицин). *Третий пример* - это точковая мутация в двух разных точках одного кодона гена *c-Ki-ras2* при остром миелоидном лейкозе и карциноме щитовидной железы, приводящая к мутациям в их белковых продуктах (замена глицина на валин и цистеин соответственно). *Четвертый пример* - это точковая мутация в гене *erbA* при

эритробластозе (замена в белке P75erb ряда аминокислот, находящихся в аминотерминальных положениях, на валин).

С другой стороны, мутации в протоонкогенах могут повысить уровень экспрессии генов за счет хромосомных перестроек или точковых мутаций в регуляторной части гена (например, в области промотора или энхансера) либо за счет амплификации или увеличения числа копий гена. В этом случае протоонкоген увеличивает свою транскрипцию. *Первый пример* - это протоонкогены c-mos (острый миелоидный лейкоз), c-myc (лимфома Беркитта) и c-abl (хронический миелоидный лейкоз), которые активируются транслокациями t(8;21), t(8;14) и t(9;22) соответственно. Их результатом может стать амплификация протоонкогена c-abl. *Второй пример* - это образовавшаяся в коротком плече хромосомы 11 делеция (например, рядом с областью расположения гена c-ras в сегменте 11p13), которая может индуцировать опухоль Вилмса. *Третий пример* - это инсерция, встроившаяся в регуляторные участки гена и представленная последовательностями некоторых ДНК-содержащих вирусов или провирусной ДНК ретровирусов, усиливающими экспрессию протоонкогенов и рост опухоли.

ГЛАВА 18 МЕТОДЫ ПЕРВОГО ЭТАПА ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

Методика обследования больных с наследственной патологией включает: первый (клинический) и второй (параклинический) этапы.

На клиническом этапе применяются: основные и дополнительные клинические, а также основные клинко-инструментальные и клинко-лабораторные методы. Кроме того, на завершающей стадии этого этапа применяется метод постановки предварительного диагноза на основе компьютерных баз данных. В случае обследования организма беременной, зародыша, эмбриона и плода дополнительно применяются специальные клинко-инструментальные и клинко-лабораторные методы преимплантационной и пренатальной диагностики.

На параклиническом этапе применяются специальные лабораторные методы, цитогенетические, молекулярно-генетические и биохимические методы, а в определенных ситуациях еще и популяционностатистический метод (см. главу 19).

МЕТОДЫ ПЕРВОГО ЭТАПА ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

Основные клинические методы

К основным клиническим методам относятся: первичный прием у врача, клинко-генеалогический метод, объективный врачебный осмотр и синдромологический метод.

Первичный прием у врача

Первичный прием у врача предусматривает работу с пробандом (консультируемое лицо) и его ближайшими родственниками. Во время первичного приема проводятся сбор данных анамнеза жизни и анамнеза заболевания и их анализ.

Собираемые врачом данные чрезвычайно важны для постановки точного диагноза, ибо они нередко содержат опорные пункты, на основе которых диагноз можно предположить сразу.

В числе таких данных должны быть собраны сведения о:

- сибсах (братья и сестры), родителях и других родственниках пробанда, как минимум I и II степеней родства;

- предыдущих беременностях и родах, периодах новорожденности, вскармливания и раннего развития пробанда;
- отягощенном характере течения данной беременности (прием лекарств, воздействие мутагенных и тератогенных факторов на эмбрион и плод, наличие у супругов вредных привычек и профессиональных вредностей);
- отягощенном акушерском анамнезе (наличие токсикозов, угрозы выкидыша, многоили маловодия, преждевременных родов, случаев предшествующего мертворождения или рождения детей с ЗВУР, ВПР, ХБ, МБ и МФЗ);
- отягощенном гинекологическом анамнезе (инфекции, передаваемые половым путем, хронические соматические заболевания неинфекционной природы).

Кроме данных о пробанде, врач собирает и анализирует данные о его близких родственниках, имеющих подобное заболевание или частично сходную симптоматику. Если такие родственники выявляются, то они приглашаются для объективного обследования.

Клинико-генеалогический метод

Клинико-генеалогический (генеалогический) метод основан на данных, полученных у пробанда или его родственников в ходе первичного приема у врача. Этот метод является обязательной составной частью первичного приема.

Генеалогический метод относится к наиболее старым методам медицины, но по-прежнему остается и будет оставаться одним из самых востребованных.

Данный метод относительно прост и доступен. Его сущность заключается в сборе врачом генеалогических данных, необходимых для последующего составления и анализа семейной родословной пробанда.

Сбор таких данных нацелен на выявление и изучение симптомов наследственного и врожденного заболевания, проявившихся у пробанда, а также у его больных и здоровых родственников.

Порядок сбора генеалогических данных и характер вопросов, задаваемых пробанду и его близким родственникам, приведены ниже. В ходе сбора данных желательно использование семейных фотоальбомов, медицинских архивов и другой документации.

При составлении родословной врач применяет стандартные приемы и символы.

Индивид, с которого начинается генеалогическое исследование, - это пробанд. Братья и сестры пробанда - это сибсы пробанда (родные, двоюродные, троюродные).

Каждый человек, включенный в семейную родословную, получает свой символ (квадрат обозначает мужчину, кружок - женщину) и шифр, состоящий из двух цифр (римская обозначает номер поколения в родословной, арабская - номер индивида в родословной; нумерация членов одного поколения осуществляется последовательно слева направо).

Имеются и другие условные обозначения (символы): аборт, гетерозиготный носитель мутантного гена, моно- и дизиготные близнецы, выкидыш (самопроизвольный аборт), мертворожденный, умерший индивид и т.д. (рис. 60). Под семейной родословной помещается ее легенда, расшифровка условно принятых обозначений. Схематическое изображение такой родословной начинается с пробанда (помечен стрелкой), который обычно располагается в последнем (изучаемом) поколении родственников. Семейная

родословная должна охватывать не менее двух-трех поколений родственников. Ограничений в количестве анализируемых поколений нет, и чем больше будет их исследовано, тем достовернее будут выводы.

Далее собираются и обозначаются данные о детях пробанда (если это взрослый человек) и его сибсах (с учетом последовательности беременностей и их исхода).

Затем собираются сведения о родственниках по линии матери: сначала все о матери пробанда, ее сибсах и их детях, затем все о бабушке по линии матери, ее сибсах и их детях и внуках. Если возможно, то собираются сведения о прабабушке пробанда. В такой же последовательности собираются сведения о родственниках по линии отца.

Следующий этап - это анализ причин имеющегося заболевания (признака). Тут принципиальное значение имеют: величина выборки, на основе которой составлена родословная (2-3 поколения родственников), полнота регистрации носителей признака и другие показатели. Необходимо помнить о фенкопиях заболевания (см. главу 3).

Современное значение клинико-генеалогического метода трудно переоценить. Собранные врачом генеалогические данные позволяют определить у пробанда наследственный или ненаследственный харак-

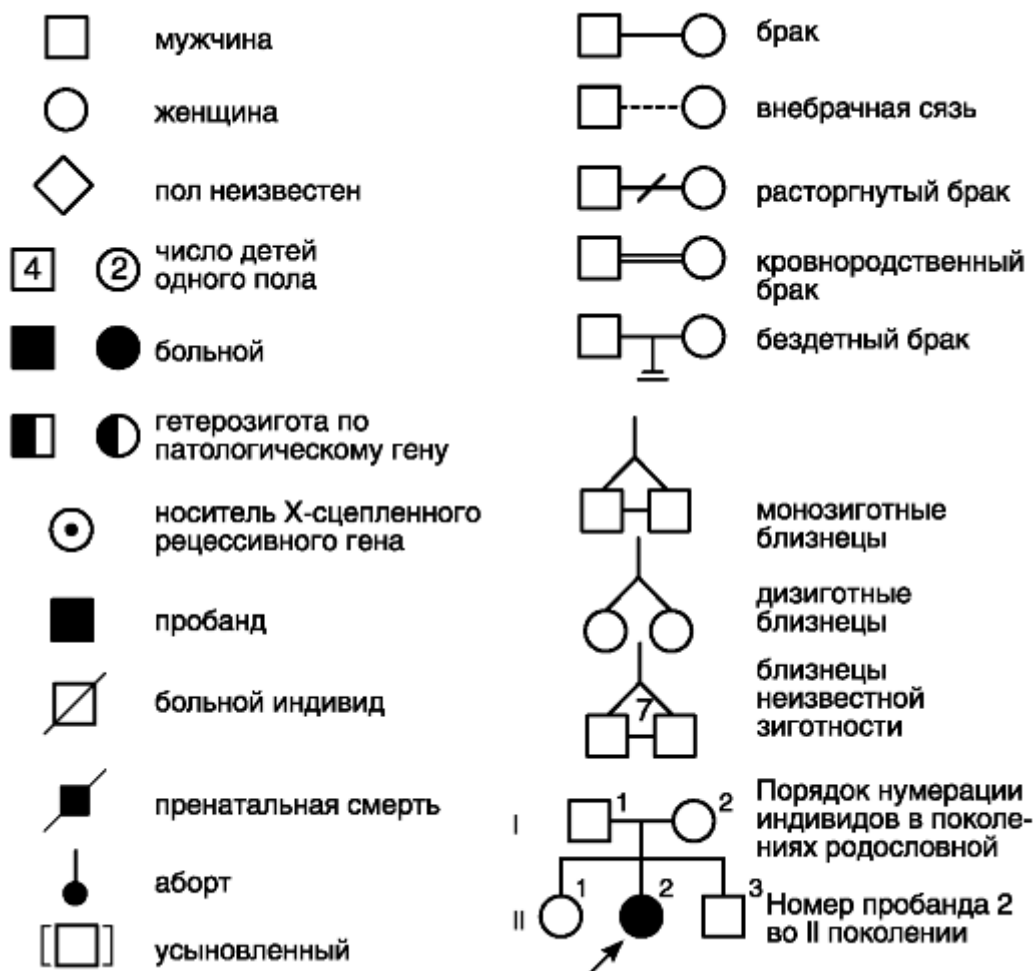


Рис.

60. Символы, используемые при составлении родословной

тер заболевания (отдельного симптома), вариант его наследования (традиционные моногенный или полигенный либо нетрадиционные варианты), установить в случае

моноклонового варианта локализацию патологического гена на аутосоме или гоносоме (т.е. картировать ген), а также определить частоту его распространения в популяции.

Клинико-генеалогический метод успешно применяется для анализа сцепления гена заболевания с его маркером (маркерным локусом). Такой анализ широко используется в диагностике гетерозиготных состояний, пренатальной диагностике, ранней диагностике заболевания в доклинической фазе, диагностике стертых форм и

при позднем проявлении болезни. Например, с помощью анализа сцепления генов (см. главу 19) диагностируются гемофилия АиВ, миодистрофия Дюшенна-Беккера, миотоническая дистрофия, синдром недоразвития ногтей и отсутствия коленной чашечки и многие другие заболевания.

После сбора генеалогических данных врач приступает к объективному осмотру пробанда и его родственников.

Объективный врачебный осмотр

Объективный врачебный осмотр начинается с изучения внешнего вида пробанда. Методической основой такого осмотра является семиотика - наука о знаках (символах) патологического процесса в организме, правильном их обозначении, морфологических и функциональных изменениях органов и частей тела, динамике клинических проявлений, т.е. идентификация символов наследственной патологии - это обязательное условие для ее успешного выявления у пробанда.

С этой целью широко используются разные предметно-образные знаки для обозначения разнообразных признаков, например: «барабанные палочки», «веслообразные ребра», «капельное сердце» и т.п.

Характерные предметно-образные знаки используются и в клинической генетике. С их помощью обозначают главные симптомы наследственного или врожденного заболевания.

Известно, что во многих случаях у больного с наследственной патологией наблюдается характерный внешний вид или знаки генетического заболевания, например: «лицо эльфа» (синдром Вильямса), «птицеголовая карликовость» (синдром Секкеля), гаргоилический дисморфизм (мукополисахаридозы и муколипидозы), «кошачий крик» (синдром делеции короткого плеча хромосомы 5), «кошачий глаз» (синдром Шмида-Фраккаро), «глаза лани» (синдром частичной моносомии по длинному плечу хромосомы 22) и т.д.

Неудивительно, что характерный внешний вид делает разных больных из разных контингентов и семей более похожими друг на друга, чем даже на близких родственников.

При внешнем осмотре пробанда внимание врача должно быть направлено также на выявление соответствующих предметнообразных знаков у близких родственников.

После внешнего осмотра врач выявляет у пробанда другие характерные особенности заболевания: время манифестации или возраст больного, на который приходится появление первых признаков, прогрессивный характер течения, множественность (полисистемность)

поражения, сегрегацию заболевания и/или его симптомов в родословной, резистентность к терапии (см. главу 17).

Следует отметить, что метод объективного врачебного осмотра должен параллельно сопровождаться синдромологическим методом (подходом), являющимся его составной частью.

Синдромологический метод

Синдромологический метод - это вторая (после семиотики) методическая основа для успешной диагностики наследственной патологии. Обязательным условием применения данного метода является знание врачом основных понятий и положений клинической генетики (см. главы 2-5).

Выявление знаков (символов), характерных для наследственной патологии, предусматривает «поэтажное» (сверху вниз) обследование организма пробанда: лицо, голова, шея, плечевой пояс и верхние конечности, грудная клетка и область живота, позвоночник, тазовый пояс и нижние конечности, наружные половые органы. При этом врач последовательно оценивает:

- весо-ростовые (антропометрические) отклонения от нормы;
- своевременность закрытия родничков, зон роста длинных трубчатых костей, так называемый костный возраст;
- тип телосложения и наличие асимметрии, пропорциональность строения скелета, головы, туловища и конечностей;
- состояние кожи, подкожной жировой клетчатки и слизистых оболочек, наличие нарушений пигментации кожи и слизистых, состояние оволосения, рост волос и ногтей;
- размеры, форму и наличие аномалий развития черепа, глаз, ушных раковин, лица, носа, рта, губ, верхней и нижней челюсти, нёба и зубов;
- размеры и форму шеи;
- размеры и форму грудной клетки: состояние грудины, ключиц, лопаток и ребер;
- наличие грыж белой линии живота, паховых и пупочных грыж;
- состояние мышц передней брюшной стенки;
- форму, длину и другие особенности строения верхних и нижних конечностей;
- степень подвижности суставов;
- состояние мышечного тонуса;
- состояние внутренних органов, эндокринных желез и репродуктивных органов;
- состояние и тип задержки развития организма, включая физическое, психомоторное (на первом году жизни), умственное (психическое), речевое и половое развитие;
- наличие и степень выраженности неврологической симптоматики, офтальмологических изменений, нарушений вкуса, обоняния, осязания, слуха, болевой и тактильной чувствительности;
- цвет и запах мочи и/или запах тела.

Из выявленных при «поэтажном» обследовании пробанда признаков врач выделяет главные признаки болезни. В их числе: *патогномоничные признаки*, например низкий рост при наследственных формах карликовости; *ведущие признаки*, например атаксия (нарушение координации и походки) и телеангиэктазии (сосудистые звездочки на коже, склерах и слизистых оболочках) при синдроме Луи-Бар; *типичные*

признаки, например сколиоз при наследственных заболеваниях соединительной ткани и скелета.

Кроме главных признаков, врач выделяет неспецифические признаки, например клинодактилию мизинца (может встречаться в норме и при синдроме Сильвера-Рассела).

Следует отметить, что все выделенные врачом признаки должны оцениваться не сами по себе, а как показатели (символы) определенного патологического процесса.

Любой признак может быть знаком наследственного заболевания, но может и не иметь символического значения, наблюдаясь у совершенно здорового человека.

Важно помнить, что диагностика и особенно дифференциальная диагностика наследственного и врожденного заболевания всегда начинается с определения патогномоничных, ведущих и типичных признаков, которые вовсе не должны подсчитываться, а скорее должны «взвешиваться» (по своему значению). Это прежде всего относится к признакам МАР, при которых количество не имеет определяющего значения без оценки каждого признака в отдельности.

Особенности врачебного осмотра при врожденных аномалиях развития

Врачебный осмотр пробанда при врожденных аномалиях развития нацелен на их полное выявление и регистрацию. Наиболее эффективно он проводится с помощью карты фенотипа пробанда (см. приложение 1). Эта карта позволяет выявить практически весь спектр больших и малых аномалий развития при «поэтажном» осмотре больного. Причем на каждом «этаже» можно обнаружить значительное число типов МАР, включая таковые черепа - 17 типов

(аномалии формы, окружности, особенности волосистой части головы); лица - 75 типов (аномалии лба, надбровных дуг, бровей, ресниц, орбит, носа, ушных раковин, ротовой области и полости рта); шеи - 6 типов; грудной клетки - 10 типов; живота - 6 типов; позвоночника и спины - 9 типов; половых органов - 10 типов; туловища в целом - 10 типов; конечностей и суставов - 18 типов; кожи и ее придатков - 14 типов.

После выявления аномалий развития подсчитывается их количество: сначала отдельно БАР и МАР, затем их общая сумма, а также число дополнительных аномалий, регистрация которых не была предусмотрена картой фенотипа.

После всех подсчетов врач определяет степень и вариант ЗВУР (гипопластический, гипотрофический или диспластический) и оценивает у пробанда: отставание массы тела от нормы при данном гестационном возрасте и росте, трофические нарушения и снижение тургора кожи, нарушения гомеостаза, иммунологической реактивности и изменения функционального состояния ЦНС.

Затем врач ставит предварительный диагноз врожденного заболевания, по возможности выделяя: моногенные пороки, наследственные синдромы, множественные ВПР, пороки мультифакториальной природы, пороки при хромосомных нарушениях и пороки неустановленного генеза. Большую помощь в постановке диагноза наследственного и врожденного заболевания врачу может оказать метод предварительного диагноза с помощью компьютерных баз данных (см. ниже).

Дополнительные клинические методы

Близнецовый метод

Близнецовый метод - это незаслуженно забытый практиками дополнительный клинический метод. Теперь он чаще применяется специалистами по медицинской психологии, став для них одним из основных методов исследования.

Вероятно, такая «забывчивость» врачей объясняется общим снижением в России показателя рождаемости детей, а на этом фоне - еще большей редкостью случаев рождения близнецов. Вместе с тем, общая частота рождения двоен в мире - 1-2% новорожденных, тогда как тройни рождаются с частотой 1 случай на 10-15 тыс. родов.

Важным аргументом в пользу применения близнецового метода является разработка на его основе таких информативных методов, как метод экспериментального изучения близнецов (см. ниже).

Сущность же близнецового метода состоит в выяснении у близнецовой пары, тройни или четверни наследственной обусловленности нормальных и патологических признаков или гено-фенотипических корреляций.

Главный принцип близнецового метода заключается в сравнении монозиготных и дизиготных близнецов. При этом вычисляются показатели соответствия (конкордантность) или несоответствия (дискордантность) и определяется частота возникновения одного и того же заболевания (признака) у близнецов в каждой паре, тройне или четверне. С одной стороны, известно, что генетическая характеристика монозиготных близнецов - это 100% общность их генов (генотипов), а особенность дизиготных близнецов - 50% общность их генов (генотипов). С другой стороны, факторы среды, как правило, одинаково воздействуют на тех и других близнецов не только на внутриутробном, но и на внеутробном этапе их развития.

Вместе с тем, иногда постнатальные условия для каждого из близнецов одной пары могут оказаться разными, и тогда фенотипические различия у дизиготных близнецов будут объясняться их генотипическими различиями. Наоборот, у монозиготных близнецов генотипы одинаковые, и возникающие у них фенотипические различия объясняются разным влиянием внешней среды на экспрессию генов в их генотипах. Иными словами, речь идет о специфических проявлениях генетического полиморфизма у близнецов двоен и троен, т.е. проявлениях небольших повторяющихся последовательностей ДНК (мини- и микросателлитных повторов).

Не исключено, что генетический полиморфизм оказывает существенное влияние на функции многих генов, включая поведенческие гены. В связи с этим не должно удивлять различие (хотя и наблюдающееся крайне редко) в характерах монозиготных близнецов, что позволяет оценивать роль генотипа и факторов среды в каждом конкретном случае как уникальную особенность организма.

Например, конкордантность по УО составляет у монозиготных близнецов 97%, у дизиготных близнецов - 37%; по шизофрении - 69% и 10%, эпилепсии - 67% и 30% соответственно, т.е. роль генотипа в данных случаях ярко выражена.

В настоящее время при применении близнецового метода выделяют: диагностику зиготности близнецов, статистическое исследование близнецовой выборки и экспериментальное изучение близнецов. В основе диагностики зиготности лежит изучение сходства и различий

у партнеров одной близнецовой пары (тройни, четверни) по совокупности ряда признаков, изменяющихся под влиянием факторов окружающей среды. С этой целью разработан *метод полисистемного сходства (подобия) по внешним признакам* (цвет и

форма волос, разрез и цвет глаз, форма ушных раковин, бровей, носа, губ, подбородка и т.д.).

Разработан *метод контроля по партнеру*, используемый только у монозиготных близнецов. Он позволяет точно оценить то или иное внешнее воздействие, если один партнер по монозиготной паре подвергся такому воздействию, а другой нет (например, прием лекарственного препарата).

Следует отметить, что подобные близнецовые исследования выгодны в экономическом плане, ибо позволяют ограничивать выборку двумя-тремя десятками пар близнецов.

К статистическому исследованию близнецовой выборки относится анкетирование близнецов, которое целесообразно проводить в популяционных исследованиях с большими выборками. Перспективно также применение близнецового метода в сочетании с другими методами (цитогенетические, биохимические и др.).

К методам экспериментального изучения близнецов относятся:

- иммуногенетический метод: сравнение по антигенам, белкам сыворотки крови, гаплотипам HLA, т.е. менделирующим признакам, которые не изменяются в течение всей жизни индивида, несмотря на воздействие факторов среды;
- исследование дерматоглифики (в настоящее время почти не применяется);
- изучение наследуемых способностей (например, чувства вкуса фенилтиокарбамида);
- изучение данных ЭКГ и ЭГ;
- трансплантация кожного лоскута.

Метод дерматоглифики

Метод дерматоглифики также забыт врачами (но уже безнадежно) и применяется лишь в судебной медицине. Сущность метода состоит в анализе врачом полученных от пробанда кожных узоров (рисунков) его ладоней и стоп. Метод наиболее информативен при хромосомных болезнях, когда, например, выявляются: дистальный осевой трирадиус, избыток дуг на пальцах, отсутствие дистальной межфаланговой складки, радиальные петли на I, IV и V пальцах, четырехпальцевая (обезьянья) складка.

В дальнейшем необходимость применения метода дерматоглифики, по-видимому, вообще отпадет из-за эффективного внедрения в медицину «ДНК-дактилоскопии».

Вместе с тем, метод дерматоглифики останется в истории медицины как метод начала эпохи развития клинической генетики.

Основные клинко-инструментальные и клинко-лабораторные методы

После применения основных и дополнительных клинических методов обследования врач в случае необходимости использует основные клинко-инструментальные и клинко-лабораторные методы.

К первым относятся: методы функциональной диагностики (антропометрия, аудиометрия, велоэргометрия, исследование объема легких и функции внешнего дыхания, исследование остроты зрения, ультразвуковое исследование, электро(эхо)кардиография, электромиография, электроэнцефалография и др., эндоскопические методы исследования внутренних органов (бронхоскопия, гастродуоденоскопия, колоноскопия, цистоскопия), а

также рентгеноскопия и рентгенография, томография и метод ядерно-магнитного резонанса.

Ко вторым относятся: биопсия и микроскопия кожи, копрология, общий анализ мочи, общий и биохимический анализы крови, определение гормонального и метаболического профилей, уровня иммуноглобулинов сыворотки крови, группы крови и резус-фактора.

Метод предварительного диагноза на основе компьютерных баз данных

Заключительной частью первого этапа обследования является проведение метода постановки предварительного диагноза на основе компьютерных баз данных. Его использование существенно повышает эффективность работы врача, позволяет ему во многих случаях предотвратить рождение в семье больного ребенка с наследственным и врожденным заболеванием и осуществить своевременное патогенетическое лечение такого заболевания.

Базы данных

В настоящее время создан и размещен в Интернете ряд удобных и эффективных для пользователя баз данных и экспертных диагностирующих систем, применяемых для предварительной диагностики МБ (4,5 тыс. нозологий), ХБ (100 нозологий) и хромосомных нарушений (900 типов), а также БАР (23 обязательных для учета ВПР).

В число наиболее известных баз данных входят:

- каталог менделирующих признаков человека В. Мак-Кьюсика (OMIM);
- Лондонская (Оксфордская) медицинская база данных (LMD);
- ряд отечественных систем.

Все эти диагностические системы позволяют врачу любой специальности при его обычном умении пользоваться компьютером быстро и надежно диагностировать по минимальному набору признаков наследственные и врожденные заболевания.

Ниже приводится краткое описание используемых с этой целью основных баз компьютерных данных.

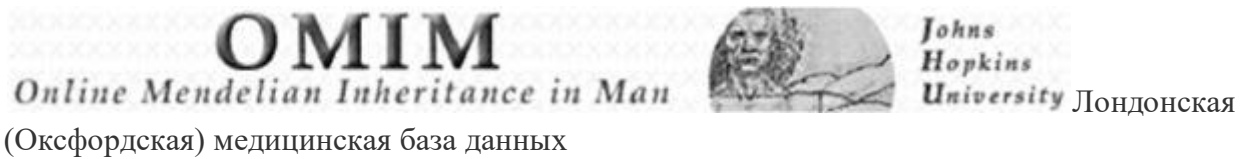
Каталог менделирующих признаков человека В. Мак-Кьюсика (OMIM)

OMIM разработан в конце 90-х годов XX в., применяется для получения данных через сеть Интернет и расположен на сайте NCBI Национального центра биотехнологии и информации. База данных содержит текстовую информацию и множество ссылок на дополнительные ресурсы в NCBI и других источниках. Поиск необходимой информации можно осуществлять, вводя одно или несколько ключевых слов в текстовом блоке.

Расширенные опции поиска доступны через закладки Limits, Preview/Index, History и Clipboard в серой области под текстовым блоком. OMIM содержит дополнительную информацию, примеры пользования основной и расширенной поисковой системами. Специальные ссылки обеспечивают быстрый доступ к подробной технической информации, информации по опциям поиска, часто задаваемым вопросам (FAQ) и информации о «родственных» ресурсах.

OMIM предназначен для использования врачами и другими специалистами, имеющими непосредственное отношение к генетическим нарушениям, учеными-генетиками и студентами-медиками, биологами. OMIM также открыта для общего пользования,

поэтому любые пользователи, ищущие информацию в базе данных, имеют возможность обращаться к ней для постановки диагноза и получения ответов на персональные вопросы. Ниже приведен логотип этой базы данных.



Лондонская (Оксфордская) медицинская база данных (Oxford Medical Databases или LMD) наиболее широко применяется в клинической практике для оказания помощи врачам в постановке диагноза заболевания, а также как источник клинической и генетической информации, позволяющий целенаправленно обследовать каждого больного.

Используя интерфейс Windows, врач с помощью этой программы получает данные в самых разных вариантах. Быстрые и гибкие средства поиска применяются для запроса необходимых сведений, которые обычно поставляются пользователю на подписной (коммерческой) основе.

Обновление базы данных ведется непрерывно с середины 80-х годов XX в. В базе содержится клиническая и генетическая информация из сотен журналов и ресурсов online. К основному перечню синдромов постоянно добавляются новые синдромы. В свою очередь, информация о синдромах, ранее включенная в базу данных, дополняется новыми сообщениями и самыми последними клиническими и генетическими сведениями.

В базе LMD имеется подробное описание каждого синдрома:

- название синдрома и наиболее часто используемые его синонимы;
- локализация гена, обуславливающего синдром, на хромосоме (если известно);
- номер по каталогу В. МакКьюсика (OMIM); в этом случае предусмотрена связь непосредственно с OMIM;
- тип наследования синдрома;
- компактный информативный обзор данных о синдроме и список литературы, посвященный ему и известный в настоящий момент;
- список признаков и симптомов синдрома;
- фотографии больных из данных литературы и/или собственных коллекций авторов.

Фотобиблиотека, интегрированная в базу данных, содержит свыше 12 500 образцов.

Используя программное обеспечение LMD, можно:

- просматривать названия синдромов в алфавитном порядке;
- отображать отдельные записи синдромов, содержащие краткое описание; характеристики, ссылки и фотографии (если доступно), локализацию генов на хромосоме, тип наследования и номер по каталогу OMIM;
- осуществлять поиск синдромов, используя определенную подборку клинических характеристик и/или любого из указанных выше типов данных;

- искать синдром по названию или используя информацию об авторе, журнале и дате публикации;
- вставлять в программу собственные фотографии пациентов;
- создавать коллекции фотографий, используя образцы из библиотеки или собственные;
- создавать списки синдромов или ссылок для дальнейшего анализа синдромов;
- распечатывать информацию и сохранять ее в отдельных файлах. Ниже приведен логотип LMD.



Отечественные информационно-поисковые диагностические системы

Мультимедийная информационно-справочная система «Врожденные пороки развития»

Мультимедийная информационно-справочная система (МИСС) «Врожденные пороки развития» сформирована в виде электронного учебника, который позволяет врачу получать необходимую клиническую и генетическую информацию для диагностики и профилактики 23 обязательных для учета ВПР.

Доступ пользователя к различным разделам программы производится на основе предметного указателя (указателя гиперссылок).

Программа выполняет следующие функции.

- 1. Предоставление информации об общей характеристике и классификации ВПР, этиологии и патогенезу, зависимости ВПР от времени возникновения в ходе внутриутробного онтогенеза, локализации в организме, частоте в популяции, тяжести ВПР и его влиянии на здоровье ребенка, систематизации по анатомофизиологическому принципу.
- 2. Предоставление информации с учетом полного перечня нозологических форм ВПР, подлежащих обязательной регистрации при их мониторинге, который проводится в регионах РФ с 1999 г.

Информация о ВПР содержит сведения об определении, популяционной частоте, этиологии и патогенезе, клинической характеристике, пренатальной диагностике, лечении, профилактике, регистрационном коде по международной классификации болезней.

МИСС ВПР предусматривает возможность распечатки визуальных (экранных) форм, содержащих текстовую информацию, таблицы, рисунки, схемы, фотографии.

Обеспечение информационного доступа осуществляется в интерактивном режиме с использованием алфавитного указателя (словаря), гиперссылок, перечня нозологических форм ВПР, подлежащих обязательной регистрации при мониторинге.

Ниже приведен логотип МИСС ВПР.

МЗ РФ

**Врожденные пороки развития
Мультимедийная информационно-справочная
система**

Версия 1.1 ©

Москва — 2004 г.

Система

диагностики наследственных нервно-мышечных заболеваний

Информационно-поисковая система диагностики (ИПСД) наследственных нервно-мышечных заболеваний (ННМЗ) создана в ГУ «Медико-генетический научный центр РАМН» коллективом авторов (Угаров И.В., Дадали Е.Л., Евдокименков В.Н. и др.).

Информационное наполнение ИПСД ННМЗ осуществлено за счет обобщения многочисленных клинических и генетических данных, отечественных и зарубежных источников литературы, ресурсов *online*.

При создании каталога признаков ННМЗ за основу взята структура клинических признаков ННМЗ из Лондонской базы данных (см. выше).

Базу иллюстративного клинического материала авторы ИПСД дополнили фотографиями больных из собственных коллекций, результатами изучения биоптатов мышечных и нервных волокон, электрофорограммами и электронейромиограммами больных с ННМЗ, предоставленными сотрудниками кафедры общей и меди-

цинской генетики медико-биологического факультета ГОУ ВПО РГМУ. Эта ИПДС рассчитана на диагностику 114 форм ННМЗ.

Вспомогательные модули поддержки принятия решения, включающие «виртуального советника» и справочные разделы, оптимизируют процедуру диагностического поиска и принятие решения в сложных диагностических ситуациях.

Ниже приведен логотип ИПСД ННМЗ.



После постановки предварительного диагноза с помощью компьютерных баз данных врач переходит ко второму этапу диагностики наследственной патологии с применением параклинических методов (см. главу 19).

Если на первом этапе диагностики возникает необходимость обследования организма беременной, зародыша, эмбриона и плода, врач применяет специальные клинко-инструментальные и клинколабораторные методы.

Специальные клинко-инструментальные и клинколабораторные методы

К специальным клинко-инструментальным и клинколабораторным методам относятся методы преимплантационной и пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней. Среди этих методов выделяют: неинвазивные (без проникновения в организм) и инвазивные (с проникновением в организм).

Методы преимплантационной диагностики

Преимплантационная диагностика - это исследование молекулы ДНК в клетках зародыша на ранней стадии развития зиготы - ста-

дии бластоциста (6-8 клеток, полученных при оплодотворении *in vitro* - неинвазивный метод) или при помощи маточного лаважа в период 90-130 ч после оплодотворения (инвазивный метод).

Суть этих методов заключается в том, что с помощью микрохирургического вмешательства от зародыша отделяются одна или две клетки для последующего генетического анализа.

Остальные зародышевые клетки замораживаются до окончания анализа. Если в анализируемых клетках исключается наследственная патология, то оставшиеся клетки размораживаются и для них создаются условия, оптимальные для нормального развития, после чего они имплантируются в матку в соответствующий период менструального цикла.

Преимущество этих методов - возможность прервать беременность при обнаружении у зародыша наследственной патологии.

Недостаток этих методов - низкий процент успешных имплантаций (всего 10-20%), а также возможные осложнения в ходе беременности после успешной имплантации зародыша.

С помощью данного метода, например, осуществима диагностика синдрома Марфана, основанная на ПЦР с обратной транскрипцией, позволяющей идентифицировать мутации в гене фибриллина.

Методы пренатальной диагностики

Неинвазивные методы

Неинвазивные методы ПД следующие:

- УЗИ - наиболее эффективный метод. Проводится в различные сроки беременности, в том числе на 18-22 нед - первое УЗИ, 25-29 нед - второе УЗИ, 32-36 нед - третье УЗИ. С помощью УЗИ выявляются: врожденные пороки сердца, дефекты нервной трубки, поликистоз почек, скелетные дисплазии, расщелина верхней губы, мягкого и/или твердого нёба, клеточная гигрома, менингоцеле, микроцефалия, полидактилия, пороки лица и наружных половых органов. УЗИ может проводиться в ранние сроки беременности (12-14 нед) с целью выявления дефектов нервной трубки.
- Электро(эхо)кардиография плода. Применяется в III триместре беременности для диагностики врожденных пороков сердца.
- Фетоскопия и фетоамниография. Применяются во II триместре беременности для биопсии клеток плаценты и клеток кожи плода (буллезный эпидермолиз).

Инвазивные методы

Инвазивные методы ПД основаны на двух подходах, с помощью которых осуществляются заборы клеток эмбриона и плода (под контролем УЗИ).

Первый подход - трансцервикальный (через влагалище и шейку матки).

Второй подход - трансабдоминальный (через переднюю брюшную стенку).

В ранние сроки беременности (8-12 нед) для лабораторного анализа используются клетки, выделенные из материала ворсин хориона (хорион-биопсия) или плаценты (плацентобиопсия). В поздние сроки беременности для лабораторного анализа используются клетки, полученные из амниотической (околоплодной) жидкости плода, или клетки, выделенные из пуповинной крови плода (см. «кордоцентез»).

Кратко рассмотрим основные инвазивные методы.

- Амниоцентез. Проводится на сроках беременности до 12 нед, а также на 16-18 нед. Позволяет анализировать в культуре клеток эмбриона или плода состояние кариотипа и молекулы ДНК; в амниотической жидкости плода определяется уровень альфафетопротеина (АФП), а в сыворотке крови плода - уровень 17-оксипрогестерона.
- Биопсия хориона. Проводится на сроках 8-12 нед беременности. Анализируются нативные клетки и клетки в культурах тканей хориона. Исследуется все то же, что и при амниоцентезе, кроме

АФП.

- Кордоцентез. Проводится на 20-22 нед беременности путем анализа пуповинной крови плода, взятой из сосудов пуповины под контролем УЗИ.

И амниоцентез, и биопсия хориона применяются в развитых странах мира примерно при 10% всех беременностей. Эти методы связаны с наименьшим риском для эмбриона и плода. С их помощью диагностируются: синдромы Дауна, Патау и Эдвардса, трипло-Х, нарушения Y-хромосомы, а также более 100 МБ (болезнь Тея-Сакса, гипофосфатемия, лейциноз, метилмалоновая ацидемия, недостаточность аденозиндезаминазы, цитруллинемия и др.).

Окончательный диагноз наследственного и врожденного заболевания врач ставит при полном завершении клинического и параклинического этапов обследования пробанда.

ГЛАВА 19 МЕТОДЫ ВТОРОГО ЭТАПА ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

ПОПУЛЯЦИОННО-СТАТИСТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Перед вторым этапом обследования больных с наследственной патологией врач может принять решение о применении популяционно-статистического метода, который не относится ни к методам первого этапа, ни к методам второго этапа диагностики наследственной патологии.

Популяционно-статистический метод - это общий эпидемиологический метод, связанный с изучением частоты распространения наследственной патологии и проявлений ее полиморфизма в разных популяционных группах. По этой причине данный метод почти не востребован клинической генетикой.

Вместе с тем, необходимость его использования может возникнуть у врача в целях научного исследования и анализа на основе обширного статистического материала внутрисемейных, межсемейных и популяционных особенностей распространения наследственного и врожденного заболевания.

Сущность метода. Среди населения Земли невозможно найти генетически одинаковых лиц, хотя общность генов хорошо прослеживается у прямых и дальних родственников. Исключением из этого правила являются монозиготные близнецы, у которых предполагается наличие 100% одинаковых генов. Вместе с тем, в общей популяции человека всегда присутствует в гетерозиготном состоянии значительное количество рецессивных и доминантных аллелей патологических генов, которые обуславливают потенциальный груз моногенно наследуемых заболеваний, и это примерно 3-5% населения.

Частота проявления генетического груза зависит от концентрации патологических аллелей, и она постепенно возрастает в малочисленных популяциях при заключении кровнородственных браков. Такие группы населения, как правило, изолированы на основе географического и/или религиозного принципов, и патологические гены

(генотипы) в них передаются через многие поколения, приводя к увеличению частоты их проявления.

В то же время в крупных по численности популяциях распространены свободные браки, и наследование патологических генов не меняет частоты их аллелей в последующих поколениях.

Как следует из закона Харди-Вайнберга, сумма частот аллелей одного гена в генофонде разных популяций является постоянной величиной: $p + q = 1$. В свою очередь, сумма генотипов аллелей данного гена также является постоянной величиной: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Следовательно, значение q или частота рецессивной аллели «а» есть корень квадратный из числа рецессивных гомозигот «аа». Тогда значение p или частота доминантной аллели «А» составит $p = 1 - q$. После этого вычисляется число гетерозигот, равное $2pq$. Таким образом, статистический анализ распространенности в популяциях аллелей патологических генов и контролируемых ими признаков, проведенный на основе популяционно-статистического метода, позволяет определять их адаптивную ценность в основном за пределами одной семейной родословной.

МЕТОДЫ ВТОРОГО ЭТАПА ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

Второй этап диагностики наследственной патологии связан с использованием параклинических методов. При их применении врач обязан соблюдать ряд профессиональных требований и правил:

- принимать самостоятельное решение (начинающий врач должен следовать решению врачебного консилиума) о назначении обследования больного пробанда с использованием параклинических методов;
- принимать личное участие в проведении назначенных им параклинических методов, чтобы быть полностью уверенным в объективности полученных результатов;
- всегда помнить, что «последнее слово» в постановке окончательного диагноза наследственного и врожденного заболевания принадлежит исключительно ему (юридическая обязанность врача), тогда как роль специалиста по параклинической диагностике (во многих случаях не врача, а биолога, физиолога или другого профессионала) в решении этого вопроса может быть только вспомогательной.

Кроме того, при переходе от лабораторной диагностики к постановке окончательного диагноза в случаях моногенного заболевания или хромосомного синдрома врачу необходимо соблюдать еще три дополнительных правила (всего их 6):

- данные объективного врачебного осмотра должны совпадать с данными лабораторной диагностики;
- должна исключаться возможность лабораторной ошибки, для избежания которой врач назначает (при малейшем подозрении на нее) проведение повторного лабораторного исследования образца биологического материала, взятого от одного и того же больного;
- в случае планирования последующего деторождения здорового ребенка в семье консультируемого лица, в которой уже диагностировано моногенное заболевание, врач обязан подтвердить или отвергнуть факт гетерозиготного носительства будущими родителями генов данного заболевания (особенно тяжелых НБО) и только на этой основе делать заключение о прогнозе здоровья потомства.

Характеристика параклинических методов

К основным параклиническим методам относятся: методы аналитической биохимии (включая аналитические системы и программные продукты), иммунологические методы, цитогенетический метод, а также молекулярно-генетические методы обследования пробанда, его больных и здоровых родственников.

Большинство параклинических методов пришли в клиническую генетику из общей генетики, молекулярной биологии, биохимии, иммунологии и других сопряженных с ней

областей молекулярной биологии и медицины. Показания для применения параклинических методов различаются в зависимости от поставленных целей и задач, одни методы применяются чаще, другие - реже.

Методы аналитической биохимии

Объектами лабораторного тестирования больного с наследственной патологией с помощью методов аналитической биохимии являются разные классы органических и неорганических соединений: аминокислоты, углеводы, липиды и их метаболиты, ионы металлов, сульфаты и др. При этом изучаются не только состав, но и концентрация структурных компонентов клеток и тканей, а также изменения активности ферментов, участвующих в их преобразованиях.

С помощью методов аналитической биохимии можно исследовать любую биологическую ткань и жидкость организма. Универсальность

этих методов широко используется в определении причин и механизмов наследственных заболеваний, выявлении гетерозиготного носительства патологических генов, а также антигенной несовместимости организмов матери и плода. Во многих случаях применяются комбинации биохимических методов с другими методами, например иммуногенетическое тестирование при анализе иммунодефицитных состояний и антигенной несовместимости матери и плода по группам крови и резус-фактору.

Другим примером служит иммуногистохимическое тестирование мышечных белков с помощью специфических антител при прогрессирующих мышечных дистрофиях Дюшенна и Беккера.

Методы аналитической биохимии бывают следующие.

- Качественные. С их помощью определяют избыточную концентрацию субстратов заблокированных ферментных реакций или их производных, накапливающихся при НБО.
- Количественные и полуколичественные. С их помощью определяют изменения концентрации веществ и нарушения кислотнощелочного равновесия.

Кроме того, разные количественные и полуколичественные методы аналитической биохимии широко применяются для эффективной диагностики НБО. Именно с этой целью была разработана и внедрена в практику здравоохранения развитых стран мира стандартная двухэтапная система обследования больных на основе программ массового (тотального) и селективного (выборочного) скрининга.

Первый этап - это экспресс-диагностика НБО у всех новорожденных (собственно массовый скрининг) или экспресс-диагностика в группах детей высокого риска конкретной наследственной патологии (селективный скрининг). Массовый скрининг охватывает популяцию целиком, а селективный - только часть популяции.

Выявляемые в ходе экспресс-диагностики наследственные заболевания, как правило, характеризуются широкой распространенностью, тяжелым прогрессирующим течением, приводящим к инвалидности при отсутствии лечения, а также наличием высокочувствительных и эффективных методов их диагностики и лечения.

В ходе массового скрининга выполняются достаточно простые, надежные и экономически выгодные (как для лечебнопрофилактического учреждения, так и для самого пациента) ориентировочные экспресс-тесты с биологическими материалами, взятыми у новорожденных (кал, кровь, мокрота, моча, пот, слюна).

Селективный скрининг также основан на простых и надежных ориентировочных экспресс-тестах. Но в этом случае могут еще использоваться специальные методы диагностики наследственных заболеваний в группах пациентов высокого риска конкретной патологии. Например, у больных с врожденной катарактой проводится диагностика галактоземии, у больных с частыми обструктивными бронхитами - диагностика муковисцидоза.

В настоящее время разработан ряд экспресс-тестов и диагностических методов.

- А. Качественные тесты с мочой:

- органолептический тест на специфический цвет и запах при алкаптонурии, 3-гидроксил-3-метилглутаровой ацидурии, изовалериановой ацидемии, лейцинозе, тирозинемии, ФКУ, цистинурии;

- тест Бенедикта при алкаптонурии, галактоземии, врожденной непереносимости фруктозы, лактазной недостаточности, приеме антибиотиков;

- тест с хлоридом железа при алкаптонурии, гиперглицинемии, гистидинемии, лейцинозе, тирозинемии, ФКУ; этот тест также является положительным при гипербилирубинемии, лактатацидозе, кетоацидозе, меланоме, плеохромоцитоме и циррозе печени;

- тест с динитрофенилгидразином (ДНФГ-тест) при алкаптонурии, гиперглицинемии, гликогенозах, лактат-ацидозе, лейцинозе, ФКУ;

- тест с п-нитроанилином при метилмалоновой ацидурии;

- сульфитный тест при недостаточности молибденового кофактора;

- тест на гомогентизиновую кислоту при алкаптонурии;

- тест с нитрознафтолом при галактоземии, тирозинемии, фруктоземии.

- Б. Полуколичественные тесты с мочой:

- тест на пролин при аминоглицинурии, пролинемии I и II;

- тест с цианид-нитропруссидом при гомоцистинурии, цистинурии;

- ЦПХ-тест при мукополисахаридозах.

Второй этап - это уточняющая диагностика. В ходе такой диагностики применяются более сложные количественные методы аналитической биохимии, а также молекулярно-генетические и молекулярноцитогенетические методы.

К количественным и качественным методам аналитической биохимии относятся: методы исследования метаболического пути, определение количества метаболитов, их кинетики и накопления.

Эти методы позволяют определить спектр разных классов органических и неорганических соединений (например, аминокислот) или концентрацию конкретного вещества (например, ФА или тирозина с помощью флуорометрии).

Среди количественных и качественных методов выделяются:

- хроматомасс-спектрометрия (ХМС) или комбинированный метод хроматографии и масс-спектрометрии, с помощью которых анализируется количество и качество (включая

молекулярную массу) желчных кислот, органических кислот (при аминокислотопатиях), холестерина и его производных (при болезнях холестерина обмена);

- электрофорез гликозаминогликанов (ГАГ) - анализируются сложные сахара при мукополисахаридозах;
- одномерная и двухмерная тонкослойная хроматография (ТСХ) - определяются спектр, количество и дефекты аминокислот, имидазолов, моно- и дисахаридов (при наследственных болезнях желудочно-кишечного тракта), олигосахаридов, мукополисахаридов, пуринов и пиримидинов, сиаловых и фенольных кислот - всего до 3000 соединений, являющихся метаболическими маркерами различных классов НБО;
- высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) - определяются аминокислоты, птеридины (при «злокачественной» ФКУ), лактат, пируват, 3-гидроксибутират и ацетоацетат (при МТБ), ионы металлов и сульфаты (при болезнях обмена металлов), карнитин и его эфиры, хлориды, стероидные и тиреоидные гормоны, пурины и пиримидины;
- газовая хроматография (ГХ) - анализируются холестерин и его производные, триацилглицериды, пиперидиновая и фитановая кислоты, жирные кислоты и плазмалогены (при пероксисомных болезнях);
- tandemная масс-спектрометрия (ТМС) - анализируются аминокислоты и ацилкарнитины, разветвленные и неразветвленные дикарбоновые кислоты (от C₆ до C₁₄).

Биологическими материалами при этих методах служат плазма или сыворотка крови (количественные тесты), а также образцы мочи (качественные тесты).

Среди более сложных методов биохимического анализа значатся: методы прямого измерения концентрации (иммунохимические методы) и определения активности ферментов (энзимодиагностика), методы оценки физико-химических и кинетических параметров мутантных белков; методы исследования мутантных белков с помощью нагрузочных проб мечеными субстратами и методы гибридизации соматических клеток.

Существуют также методы исследования структуры мутантного гена с помощью рестрикционного анализа.

Аналитические системы и программные продукты

Говоря о значении методов аналитической биохимии для протеомики, следует отметить, что в настоящее время в России основная часть протеомных исследований выполняется с использованием стандартного метода двухмерного гель-электрофореза на полиакриламидном геле или метода 2-D PAGE. Вместе с тем, наиболее ощутимый прорыв в протеомике может быть обеспечен широким применением комбинаций методов ВЭЖХ и ТМС.

В пользу такого прогноза свидетельствуют результаты анализа образцов протеинов человека с помощью программного пакета TurboSEQUENTTM для автоматической идентификации протеинов. Этот пакет обеспечивает быструю и точную идентификацию даже при низких концентрациях белков в сложных смесях. Например, при применении жидкостного хроматографа «Surveyor» и массспектрометрического детектора «LCQ DECA XP» с анализатором - ионной ловушкой в течение всего 5 ч можно идентифицировать 95 протеинов, тогда как при применении стандартного метода 2-D PAGE - только 25 протеинов при более значительных затратах времени.

К современным протеомным аналитическим системам также относятся следующие.

- ВЭЖХ Surveyor LC, которую характеризуют: короткий цикл анализа образцов, высокая производительность, позволяющие при малых скоростях потоков создавать условия для исследования огромного количества образцов. Система включает модуль подготовки растворителей - Solvent Platform, насос Surveyor MS Pump со встроенным дегазатором, автодозатор Surveyor Autosampler и детектор - фотодиодную матрицу Surveyor PDA.
- Система Finnigan LCQ ADVANTAGE обеспечивает быструю идентификацию компонентов анализируемых образцов. Это компакт-
- ный настольный масс-спектрометр с анализатором - ионной ловушкой, способный выполнять исследования с подтверждением молекулярной массы, а также структурные анализы методом ВЭЖХ МС/МС. Селективность МС/МС обеспечивает идентификацию соединений путем их сравнения со спектральной библиотекой, что дает возможность получать количественные результаты для сложных матриц. Усовершенствованная система Finnigan LCQ DECA XP или идеальный масс-спектрометр (самый высокочувствительный прибор среди всех систем ВЭЖХ) для изучения метаболизма, анализа чистоты биологических образцов, идентификации протеинов и других сложных молекул, позволяющий полностью исследовать их структуру.

Таким образом, хроматография, масс-спектрометрия, аналитические системы и программные продукты относятся к основным инструментам современных исследований в протеомике.

Цитогенетические методы

Как сказано в главе 1, развитие цитогенетики начиналось с применения методов анафазного и телофазного анализа хромосом, затем появился более совершенный метод метафазного анализа хромосом, а в начале 80-х годов большое распространение получил самый информативный метод - анализ прометафазных хромосом.

Прометафазный метод подтвердил существование микрохромосомных мутаций: микроделений, микродупликаций, парацентрических инверсий, лежащих в основе ряда наследственных болезней.

Такие микроперестройки хромосом нередко сопровождают рак. Например, свыше 500 нозологий МБ проявляются неоплазией, и среди них каждое второе заболевание сопровождается микроперестройками хромосом.

В клинической генетике с помощью цитогенетических методов проводится обследование пробанда, его больных и здоровых родственников или обследование плода при подозрении на хромосомное нарушение.

Таким образом, цитогенетические методы диагностики применяются для кариотипирования и цитогенетического анализа хромосомного набора пробанда, его больных и здоровых родственников (см. главу 2).

Иммунологические методы

В середине XX в. были разработаны применяемые при подозрении на наследственные иммунодефицитные состояния (атаксиятелеангиэктазия, дис- и агаммаглобулинемия и др.) иммунологические методы. С их помощью исследуют антигенную несовместимость матери и плода, устанавливают биологическое отцовство, изучают генетические маркеры при анализе сцепления генов и оценке наследственной предрасположенности к болезням (гены с выраженным фенотипическим проявлением). В числе таких методов значатся: анализ гамма-глобулинов, В- и Т- лимфоцитов, содержания комплемента в крови,

исследование функции фагоцитарных клеток, определение HLA-антигенов в лейкоцитах и др.

Молекулярно-генетическая диагностика: подходы и характеристика

Целью молекулярно-генетических методов диагностики наследственной патологии является определение нарушений молекулярной структуры и функционирования генов, их белковых и небелковых продуктов. Эти методы относятся к основным диагностическим тестам, применяемым в клинической генетике последних лет.

Необходимость разработки этих тестов была обусловлена молекулярной природой наследственной патологии, ее выраженным генетическим и клиническим полиморфизмом, наличием аллельных серий, генокопий и фенокопий и другими особенностями, создающими для врача трудности в дифференциальной диагностике заболеваний (см. главы 2-5 и 17).

Широкое распространение получила ДНК-зондовая диагностика, или ДНК-диагностика.

Известно, что молекула ДНК, являясь главной молекулой жизни, сохраняет свою стабильность в течение всего онтогенеза (см. главы 2 и 12). Эта молекула одинакова во всех клетках, что делает ее абсолютно пригодной для диагностики наследственной патологии.

Задача ДНК-диагностики.

- Исследование мутаций патологического гена - это прямой подход. Используется в случаях, когда известны ген заболевания и его основные мутации, например, для диагностики муковисцидоза (мажорная мутация - del F508), ФКУ (R408W), хорей Гентингтона (экспансия CTG-повторов). Кроме того, прямой подход применяется для выявления в популяции гетерозиготного носительства
- генов рецессивно наследуемых заболеваний у родителей и родственников больного пробанда. Анализ сегрегации (накопления) заболевания в семейной родословной, характеризующейся наличием измененных аллелей полиморфных (маркерных) локусов, тесно сцепленных с патологическим геном (однонуклеотидные замены, делеции, инсерции оснований, нуклеотидные повторы) - это косвенный подход. Такой подход применяется в тех случаях, когда прямой подход не дает результата (например, при большой протяженности и сложной организации гена, а также при широком спектре его мутаций) или когда не выделен патологический ген, а известна только его локализация на хромосоме. Объектом исследования при косвенной ДНК-диагностике являются полиморфные сайты - *микросателлитные повторы* (мономеры) протяженностью до 5 н.п. и *минисателлитные повторы* (мономеры), содержащие 5-60 н.п. И микро-, и минисателлитные повторы разбросаны по всему геному и наследуются по моногенному варианту.

Вместе с тем, наиболее типичными считаются *микросателлитные сайты* (динуклеотидные повторы), в том числе самый распространенный СА-повтор (цитозин-аденин).

Оба подхода (прямой и косвенный) базируются на идентификации небольших и строго определенных фрагментов молекулы ДНК с последующим анализом при помощи электрофореза в агарозном (или полиакриламидном) геле либо с помощью радиоавтографии.

Следует отметить, что золотым стандартом ДНК-диагностики наследственной патологии (особенно МБ) является комплексное применение и прямого, и косвенного методов, что позволяет врачу получить наиболее адекватный результат.

Базовые методы ДНК-диагностики

В основе многочисленных методов ДНК-диагностики лежат два базовых метода: блот-гибридизационный анализ и ПЦР.

Блот-гибридизационный анализ

Блот-гибридизационный анализ - это самый первый метод исследования молекулы ДНК, предложенный Э. Саузером еще в 1975 г. Именно этот метод стал универсальной технологической основой для идентификации мутаций в патологических генах.

Сущность метода заключается в следующем: ДНК, выделенная из биоптата органа, ткани или культуры лимфоцитов периферической

крови, подвергается расщеплению рестриктазами*, которые «узнают» в ней строго определенную последовательность нуклеотидов. Несмотря на нарезание рестриктазами множества фрагментов ДНК разной длины, их набор для каждого индивида всегда постоянен по количеству и величине данной рестриктазы.

Далее из множества нарезанных фрагментов нужно найти один или несколько фрагментов ДНК с определенной последовательностью и охарактеризовать их. С этой целью полученную смесь фрагментов подвергают электрофорезу, в ходе которого фрагменты ДНК разделяются по размеру (мелкие в геле мигрируют быстрее больших). Затем разделенные фрагменты «перепечатают» на целлюлозный фильтр или нейлоновую мембрану, фиксируют и подвергают гибридизации с зондом (олигонуклеотидом), интенсивно меченным радиоактивным изотопом или флуоресцентной меткой.

Такой зонд является ключевым элементом - это искусственно клонированная с помощью генно-инженерных методов нуклеотидная последовательность конкретного гена. Именно зонд выявляет необходимый фрагмент, присутствующий среди исследуемого множества фрагментов. При этом происходит специфическое связывание последовательностей зонда с комплементарными ему последовательностями фрагмента ДНК, зафиксированного на фильтре.

Далее следует отмывка несвязанной с фильтром радиоактивной метки и экспозиция фрагмента на рентгеновской пленке. Изменение положения фрагмента по сравнению с контролем, его исчезновение или появление нового фрагмента свидетельствуют о перестройках последовательностей нуклеотидов в исследуемом гене или его ближайшем окружении.

В настоящее время блот-гибридизационный анализ ограниченно применяется для гибридизации ДНК-зондов с электрофоретически разделенными молекулами РНК (нозерн-блот) или молекулами белков, фиксированных на фильтре с мечеными антителами (вестерн-блот).

Полимеразная цепная реакция

ПЦР - второй по значимости метод ДНК-диагностики, метод специфической амплификации (копирования или умножения), зна-

* Рестриктазы - это своеобразные «биологические ножницы». В настоящее время получены рестриктазы, «узнающие» более 500 специфических последовательностей нуклеотидов с длиной от 4 до 8 пар и более.

чительно потеснивший блот-гибридизационный анализ. Метод ПЦР был предложен в 1983 г. К. Муллисом, удостоенным за его разработку Нобелевской премии в 1992 г.

Метод ПЦР позволяет в течение одного часа увеличить *in vitro* в миллионы раз количество заданного фрагмента геномной ДНК (имеющего длину от нескольких десятков до нескольких тысяч н.п.), что существенно облегчает поиск искомой мутации или изучение полиморфных сайтов.

Необходимым условием для проведения ПЦР служит знание нуклеотидных последовательностей ДНК, фланкирующих участок амплификации (находятся на его флангах). Такие участки называются «затравками» или олигопраймерами. Их длина - 20-30 пар оснований, они комплементарны 3'-концам амплифицируемых участков на смысловой и антисмысловой нитях ДНК.

На основе свойства комплементации определяют длину амплифицируемых участков, соответствующую расстоянию между олигопраймерами.

Принципиальная схема ПЦР приведена на рис. 61. ПЦР идет в четыре этапа на специальных программных термоциклерах, задающих и поддерживающих определенный температурный режим реакции. Компонентами этой реакции служат: матричная ДНК, олигопраймеры, смесь дезоксинуклеотидов и термофильная ДНК-полимераза. Их добавляют в специальный солевой буфер непосредственно перед помещением пробирки в термоциклер. На *первом этапе* реакции двухнитевая матричная ДНК переводится в однострунчатую форму при нагревании в течение нескольких минут до температуры 95-98 °С. На *втором этапе* (этап гибридизации) температура реакционной смеси снижается до 30-50 °С, и олигопраймеры гибридизируются с денатурированной (одноцепочечной) ДНК, содержащей комплементарные участки. На *третьем этапе* температура повышается до 60-70 °С (она оптимальна для термофильной ДНК-полимеразы), что позволяет запустить синтез ДНК в направлении от 5'- к 3'-концу геномной ДНК-матрицы. На *четвертом этапе* происходит дальнейшее повышение температуры до 80-90 °С, что прекращает синтез ДНК, и начинается денатурация с освобождением синтезированных фрагментов ДНК с геномной матрицы.

В результате образовавшиеся фрагменты ДНК становятся матрицами для следующих циклов амплификации, и процесс может протекать в геометрической прогрессии, давая необходимое количество циклов. Если один полный цикл амплификации занимает 1-2 мин,

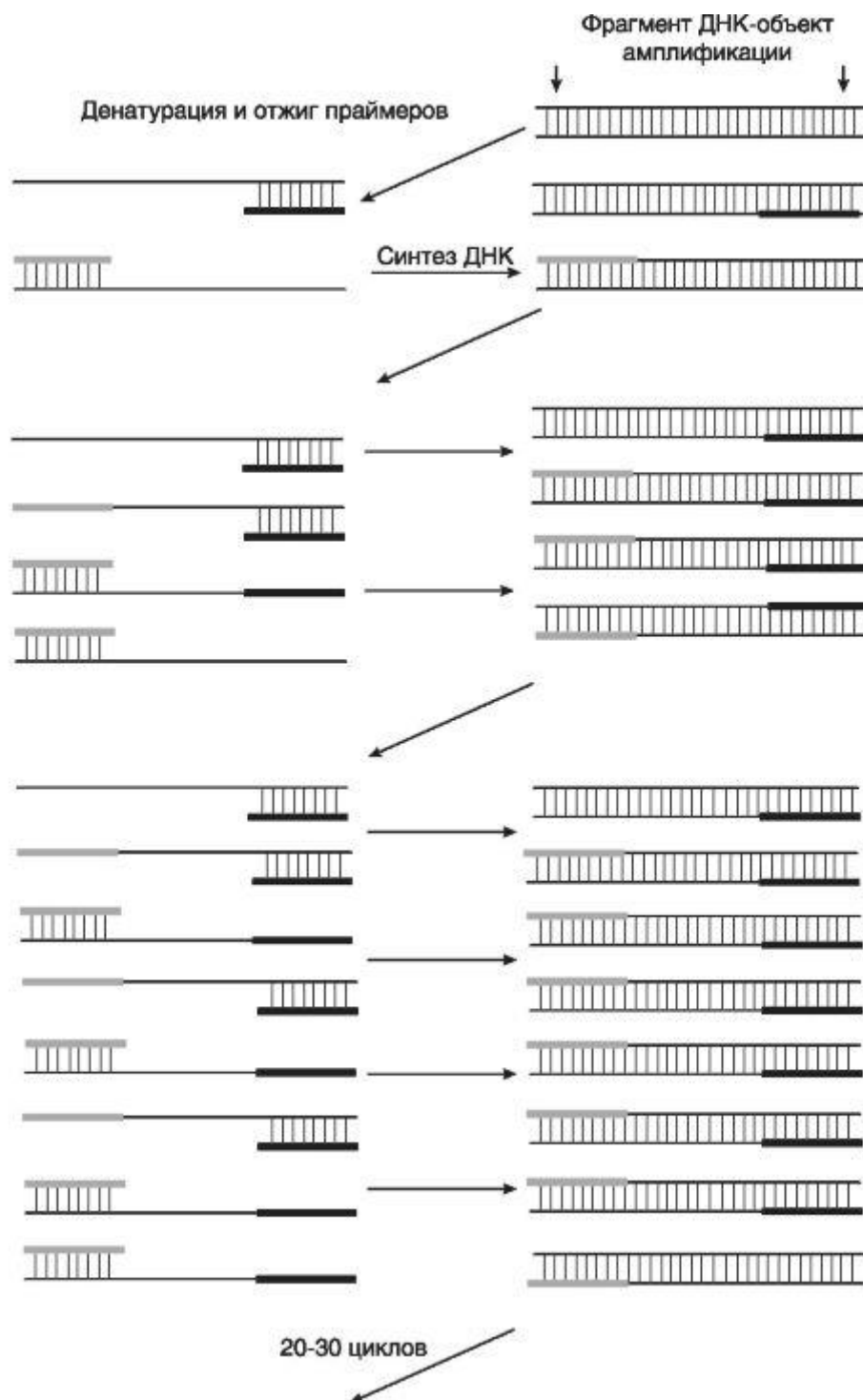


Рис.

61. Принципиальная схема ПЦР (по Баранову В.С., Иващенко Т.Э., 2005)

то в течение 25-30 циклов количество синтезированных копий ДНК достигнет несколько миллионов. При этом выбор оптимального режима работы определяется длиной и специфичностью амплифицируемого участка молекулы ДНК.

Анализ результатов ПЦР проводится с помощью гельэлектрофореза продуктов амплификации, которые в случае необходимости обрабатываются рестриктазами. В дальнейшем гели окрашивают бромидом этидия и исследуют продукты рестрикции в проходящем УФ-свете с длиной волны 380 нм на наличие в них невыявленных мутаций. Таким образом, ПЦР служит универсальной моделью для получения образцов фрагментов ДНК, обуславливающих развитие наследственной патологии.

В настоящее время на основе ПЦР разработано множество диагностических тестов, позволяющих эффективно диагностировать самые разные формы наследственной патологии.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДНК-ДИАГНОСТИКИ

Методы идентификации мутаций генов наследственных болезней

К методам идентификации мутаций генов наследственных болезней относятся: идентификация известных мутаций, идентификация невыявленных мутаций, идентификация мутаций и генетических полиморфизмов.

Идентификация известных мутаций

В настоящее время идентифицированы сотни генов, мутации в которых вызывают моногенные и мультифакториальные заболевания. Созданы банки данных об этих генах, отражающие спектр, классификации и механизмы возникновения мутаций, а также методы их диагностики. Во многих генах выделены мажорные (наиболее часто встречающиеся) мутации, разработаны алгоритмы молекулярной диагностики.

Кроме того, созданы коммерческие наборы, выявляющие в автоматическом режиме сразу несколько диагностически значимых мутаций в генах разных заболеваний, например миодистрофии Дюшенна-Беккера, МВ, серповидно-клеточной анемии и ФКУ.

Из известных точковых мутаций наиболее просто диагностируются однонуклеотидные замены, которые приводят или к исчезнове-

нию, или к образованию сайта узнавания эндонуклеаз (рестриктаз) после обработки этими ферментами амплифицированного фрагмента ДНК, содержащего мутацию. Сайт узнавания (рестрикции) - это специфическая область ДНК размером в 5-6 нуклеотидов.

К методам выявления известных мутаций также относятся следующие.

Амплификации рефрактерной мутационной системы

Метод амплификации рефрактерной мутационной системы (ARMS) предложен C.R. Newton et al. и C.D.K. Bottema et al. в 1989-

1990 гг.

Суть метода состоит в параллельной постановке двух ПЦР, для одной из которых праймером служит аллельспецифическая мутантная ДНК, а другой - нормальные олигонуклеотидные последовательности ДНК. При этом в качестве второго праймера в двух реакциях выбирают одну и ту же олигонуклеотидную последовательность, чтобы могли амплифицироваться участки ДНК одинаковой протяженности.

В исследуемой ДНК амплифицированные фрагменты образуются только в том случае, если в качестве аллельспецифического праймера выбирается мутантная последовательность, тогда как нормальный олигонуклеотидный праймер блокируется.

Метод нашел широкое применение при идентификации мутаций в генах МВ, бета-талассемии, ФКУ и для типирования генов HLA- системы.

При применении этого метода возможно полное автоматическое сканирование.

ПЦР-опосредованный сайт-направленный мутагенез

Метод ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза предложен H.G. Eiken et al. и I.S.L. Ngo et al. в 1991 г.

Суть метода состоит в том, чтобы выбор амплифицируемого участка ДНК соответствовал следующим требованиям:

- 3'-конец одного из праймеров должен примыкать непосредственно к мутантному сайту;
- один из нуклеотидов со стороны 3'-конца следует изменить так, чтобы он в сочетании с нуклеотидом мутантного сайта мог создать (или не создать) в этом месте сайт рестрикции для какойлибо нуклеазы.

Таким образом, обязательным условием является то, что ПЦРпродукты с нормального и мутантного аллелей должны отличаться

по наличию индуцированного сайта рестрикции. В результате на электрофореграмме у гомозигот будет присутствовать два фрагмента, содержащих мутацию, а у гетерозигот - один фрагмент, и все они должны соответствовать по длине рестрифицированным участкам молекулы ДНК.

К сожалению, из-за наличия этого обязательного условия данный метод почти не востребован в диагностике наследственных болезней. Аллельспецифические олигонуклеотиды

Метод аллельспецифических олигонуклеотидов (ASO) предложен J. Reiss в 1991 г. Суть метода состоит в амплификации фрагментов ДНК и последующей гибридизации с мечеными аллельспецифическими олигонуклеотидами, к которым обычно относятся последовательности размером 19 н.п., имеющие в центре мутантный сайт.

При этом каждый из двух зондов должен быть комплементарным к нормальному или мутантному вариантам ДНК. Условия гибридизации подбирают таким образом, чтобы стабильные дуплексы образовывались при полной комплементации гибридных пар. В таких условиях амплифицированные фрагменты ДНК без мутации будут гибридизоваться только с нормальным зондом, ДНК гомозигот с мутацией - только с мутантным зондом, а ДНК гетерозигот - с обоими маркерными зондами.

В 1994 г. И.В. Лебедева и соавторы предложили модифицированный вариант этого метода с использованием аллельспецифических ДНК-зондов, меченных биотином или пероксидазой хрена (метод применяется для автоматической регистрации мажорных мутаций при муковисцидозе и серповидноклеточной анемии).

В модификации F.F. Chebaba (1993) для автоматического анализа используется принцип ленточного фильтра (стрипта) с нанесенными пятнами олигопраймеров, каждый из которых соответствует определенной мутации. Стрипт помещают в раствор со смесью меченых амплифицированных фрагментов и создают условия для гибридизации, после чего выявляют тестируемые мутации. Именно этот принцип использован в ряде новых технологий исследования мутаций и генетических полиморфизмов (см. ниже).

Лигирование синтетических однонуклеотидных зондов

Метод лигирования синтетических однонуклеотидных зондов (OLA) был предложен U.N. Landergren в 1993 г. Суть метода состоит в том, что ДНК-зонды для лигирования подбирают так, чтобы они были полностью комплементарными нормальному фрагменту ДНК

в области локализации мутации, причем сама нуклеотидная замена должна находиться на стыке двух праймеров.

После гибридизации синтезированные нуклеотидные фрагменты сшиваются ДНК-лигазами, выделенными из термофильных микроорганизмов. В результате при наличии мутаций в анализируемом участке ДНК на конце одного из зондов образуется сайт некомплементарного спаривания, непосредственно примыкающий к месту лигирования. Сшивки между зондами в этом случае не происходят.

Метод включает несколько циклов гибридизации, лигирования и денатурации с последующим электрофоретическим анализом меченых одонитевых фрагментов ДНК. Метод был успешно применен для тестирования глобиновых генов при серповидноклеточной анемии и мутации F508 при МВ.

Идентификация невыявленных мутаций

Как оказалось, с помощью ПЦР выявляются не только протяженные делеции амплифицированных фрагментов ДНК, но и небольшие делеции и вставки единичных нуклеотидов, которые влияют на размеры этих фрагментов. Например, такие изменения можно зарегистрировать при электрофорезе в агарозном или полиакриламидном гелях при исследовании наиболее часто встречающихся мутаций в гене МВ (делеции трех нуклеотидов или del F508).

Вместе с тем, при замене одного или нескольких нуклеотидов в гене длина амплифицированного фрагмента остается неизменной, тогда как некоторые физико-химические свойства мутантной молекулы меняются. Разработаны разные варианты поиска мутантных фрагментов ДНК и идентификации в них точковых мутаций. Основными из них являются следующие методы.

Анализ конформационного полиморфизма одонитевой ДНК или выявление точковых мутаций

Метод анализа конформационного полиморфизма одонитевой ДНК или выявления точковых мутаций (метод SSCP), предложен М. Orita et al. (1989) и D. Clavac, M. Dean (1993). Метод получил широкое распространение. Метод включает амплификацию фрагментов размером от 50 до 300 н.п., их денатурацию и электрофорез в полиакриламидном геле. Эффективность обнаружения (детекции) мутаций при размерах фрагмента менее 200 н.п. составляет 70-95%, а при длине более 400 н.п. уменьшается до 50%. Метод основан на регистрации различий в электрофоретической подвижности одонитевых фрагментов молекулы ДНК (одинаковых по величине, но разных по пространственной ориентации) вследствие имеющихся в них разных нуклеотидных замен, что влияет на конформацию (скручивание) небольших одонитевых фрагментов.

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез

Метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGCE) был предложен Р. Майерс и др. (1990), а также R. Fodde и M. Losekoot (1994). Метод основан на зависимости свойств денатурации небольших двухнитевых молекул ДНК от их нуклеотидной последовательности (соотношение АТ-пар и ГЦ-пар).

Различия выявляются при сравнении подвижности нормальных и мутантных двухнитевых фрагментов ДНК при их электрофорезе в условиях денатурации благодаря разности температур при создании градиента концентрации мочевины или формальдегида в геле.

Метод пригоден для анализа крупных фрагментов ДНК. Его разрешающая способность при исследовании фрагментов до 600 н.п. составляет 95%.

Метод эффективно применяется при анализе индуцированных точковых мутаций, возникающих в одной из 100 клеток, обработанных мутагеном. Однако он технически сложен и отличается высокой стоимостью.

Гетеродуплексный анализ

Метод гетеродуплексного анализа (НА) предложен W. Hiao и P.J. Oefner в 2001 г. Позволяет идентифицировать мутации, локализованные в одной из нитей матричной ДНК и находящиеся в гетерозиготном состоянии. В амплифицированной смеси наряду с двумя типами гомодуплексов (нормальная и мутантная последовательности нуклеотидов) возникают гетеродуплексы между нормальной и мутантной цепочками ДНК.

У мутантных гетеродуплексов иная подвижность, чем у гомодуплексов (за счет конформационных особенностей в местах несовпадения нуклеотидов - mismatch), что выявляется при электрофорезе в полиакриламидном геле.

Разрешающая способность метода при исследовании фрагментов менее 300 н.п. достигает 80-95%.

Имеются модифицированные варианты этого метода, например, дополненные конформационно-чувствительным гель-электрофорезом в сочетании с флуоресцентными красителями - метод CSGE (широко используется для поиска мутаций в разных генах); метод жидкостной хроматографии - метод DNPLC (см. ниже).

Химическое расщепление некомплементарных сайтов

Метод химического расщепления некомплементарных сайтов или метод СМС, предложен М. Grompe в 1993 г. Информативность - 95-100%. Метод основан на способности ряда химических соединений или ферментов специфически разрывать нить ДНК в месте локализации неспаренного основания (рис. 62).

В частности, высокой чувствительностью к гидроксиламину отличается неспаренный цитозин, а к тетраоксиду осмия - неспаренный тимин. Последующая обработка такой молекулы ДНК пиперидином ведет к ее полному разрыву в модифицированном сайте.

Суть метода СМС заключается в выявлении мутаций с помощью меченых ДНК-зондов, соответствующих нормальному варианту молекулы ДНК. Такими зондами служат синтезированные олигонуклеотиды, клонированные участки ДНК или амплифицированные фрагменты. При применении метода эталонную меченую ДНК смешивают с избытком тестируемой ДНК или РНК. К тестируемым образцам ДНК относятся клонированные ДНК, обработанные соответствующими эндонуклеазами, либо амплифицированные фрагменты. Смесь нагревают до полной денатурации двухнитевых молекул и после этого охлаждают, чтобы создать условия для образования дуплексов.

При наличии мутаций в тестируемых образцах ДНК (в гетеродуплексах, возникших в результате гибридизации между одонитевыми молекулами эталонной и тестируемой ДНК) образуются места негомологичного спаривания.

После обработки соответствующими химическими агентами на основе электрофореза и радиоавтографии проводится идентификация и локализация мутантных сайтов в исследуемых участках ДНК. Появление укороченных фрагментов ДНК на электрофореграмме указывает на наличие мутантного сайта, а определение размера

укороченного фрагмента выявляет локализацию этого сайта в тестируемой молекуле ДНК.

Большими преимуществами метода СМС являются:

- возможность исследовать протяженные участки ДНК (до 2 тыс. н.п.);
- возможность одновременно выявлять (локализовать) несколько мутаций в одном фрагменте ДНК;
- возможность использовать несколько ДНК-зондов для поиска мутаций (при мультиплексном варианте метода).

В последние годы для идентификации точковых нуклеотидных замен широкое применение получил флуоресцентный вариант этого метода.

Идентификация мутаций и генетических полиморфизмов

Денатурирующая жидкостная хроматография высокого разрешения

Метод денатурирующей жидкостной хроматографии высокого разрешения (DNPLC) был предложен Р.Ј. Oefner и Р.А. Underbill в 1995 г. Позволяет в течение 2-3 мин определить однонуклеотидные замены, делеции и инсерции в амплифицированных участках с размерами до 1,5 тыс. н.п. Информативность метода достигает 95%. Метод представляет собой модифицированный вариант гетеродуплексного

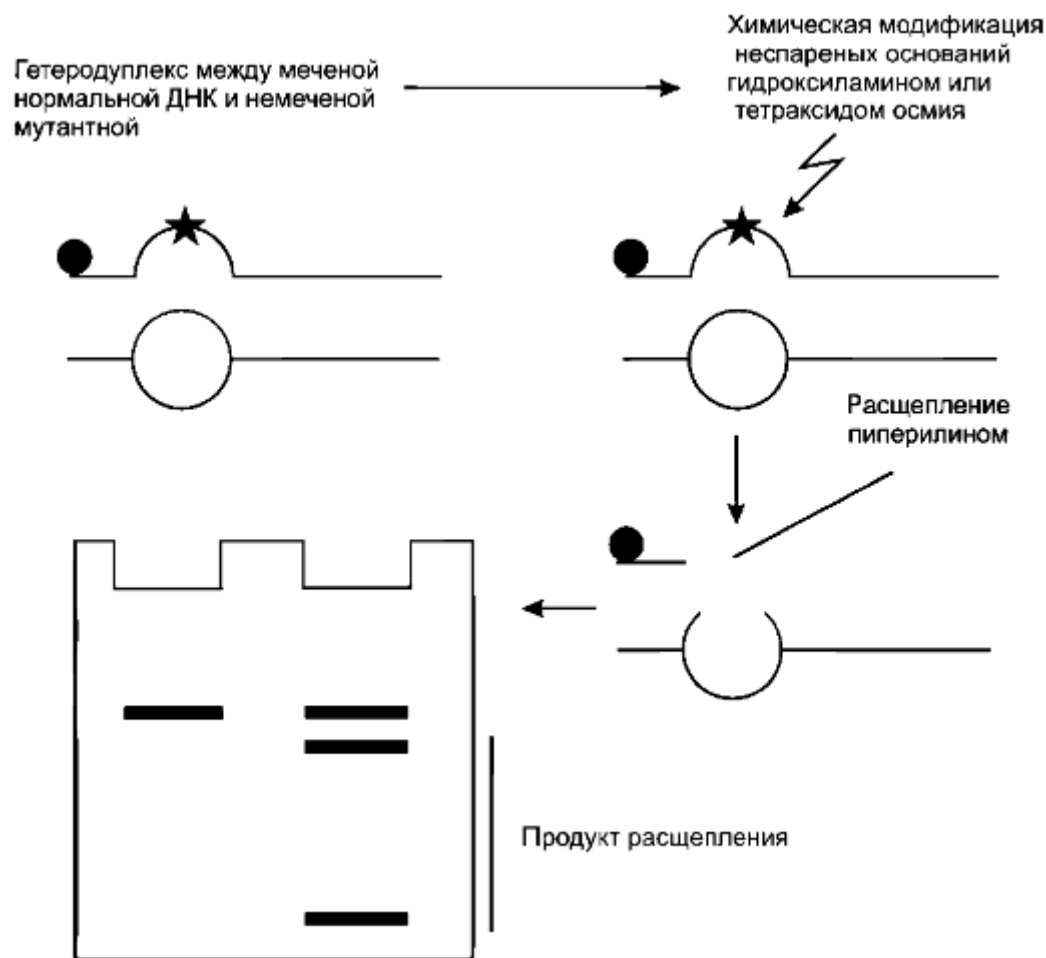


Рис.

анализа с последующим автоматическим анализом результатов при помощи жидкостной хроматографии (см. выше).

Согласно этому методу, продукты ПЦР исследуемого фрагмента ДНК подвергаются частичной денатурации в растворе с контрольными образцами того же фермента в соотношении 1:1 путем нагревания смеси до 95 °С и медленной последующей ренатурации (охлаждение).

При отсутствии мутаций в исследуемом фрагменте формируется только один тип гомодуплексов, тогда как при наличии мутаций - несколько типов гетеродуплексов и гомодуплексов.

Возникающие гетеродуплексы значительно менее устойчивы к температуре, чем гомодуплексы. Именно это свойство улавливается с помощью жидкостной хроматографии.

Предварительный подбор температур плавления гомо- и гетеродуплексов резко повышает чувствительность данного метода по сравнению с таковой SSCP-метода (см. выше), метода двухмерного сканирования гена и собственно гетеродуплексного анализа (см. выше).

Метод DNPLC широко используется при генотипировании путем определения однонуклеотидных замен (SNP) и EST (Hiao W. и Oefner P.J., 2001), а также при первичном анализе мутаций в генах-кандидатах, изучении молекулярных маркеров и мутаций Y-хромосомы и вообще при картировании генов.

Поверхностный плазмонный резонанс

Метод поверхностного плазмонного резонанса (метод SPR) основан на одноименном явлении, представляющем квантово-оптический (оптико-электронный) феномен, возникающий в результате взаимодействия между поляризованным светом с определенной длиной волны и поверхностью металла.

Метод SPR позволяет выявлять молекулы ДНК и контролировать процесс связывания между двумя молекулами и более в режиме реального времени. Взаимодействие фрагментов ДНК приводит к изменению показателя преломления света в поверхностном слое чувствительного датчика, которое фиксируется как изменение в интенсивности сигнала SPR. При этом одна из взаимодействующих молекул в реальном времени отражается на сенсорограмме.

Уже при введении образца проба связывается с иммобилизованными на поверхности чувствительного датчика олигонуклеотидами, что усиливает сигнал SPR. В конце процедуры введения

образца проба изменяется под непрерывной струей буфера, и наблюдающееся уменьшение сигнала SPR отражает диссоциацию пробы от поверхностно-связанного комплекса. В зависимости от нуклеотидного состава исследуемой молекулы ДНК характер ассоциации и диссоциации изменяется (рис. 63). ДНК-чипы

С помощью метода ДНК-чипов достигнуты значительные успехи в идентификации и массовом сканировании однонуклеотидных замен (SNP).

- Чипы (arrays) - это серии коротких олигонуклеотидных последовательностей, отличающихся по своему составу и зафиксированных (химическими способами) на стекле таким образом, что на 1 см² их размещается до 1000. При этом позиция каждого чипа четко фиксируется и может определяться в автоматическом режиме. В настоящее время

применяются 3 типа чипов. Гибридизационные чипы. Они разработаны на основе аллельспецифической гибридизации. Это олигонуклеотидные последова-

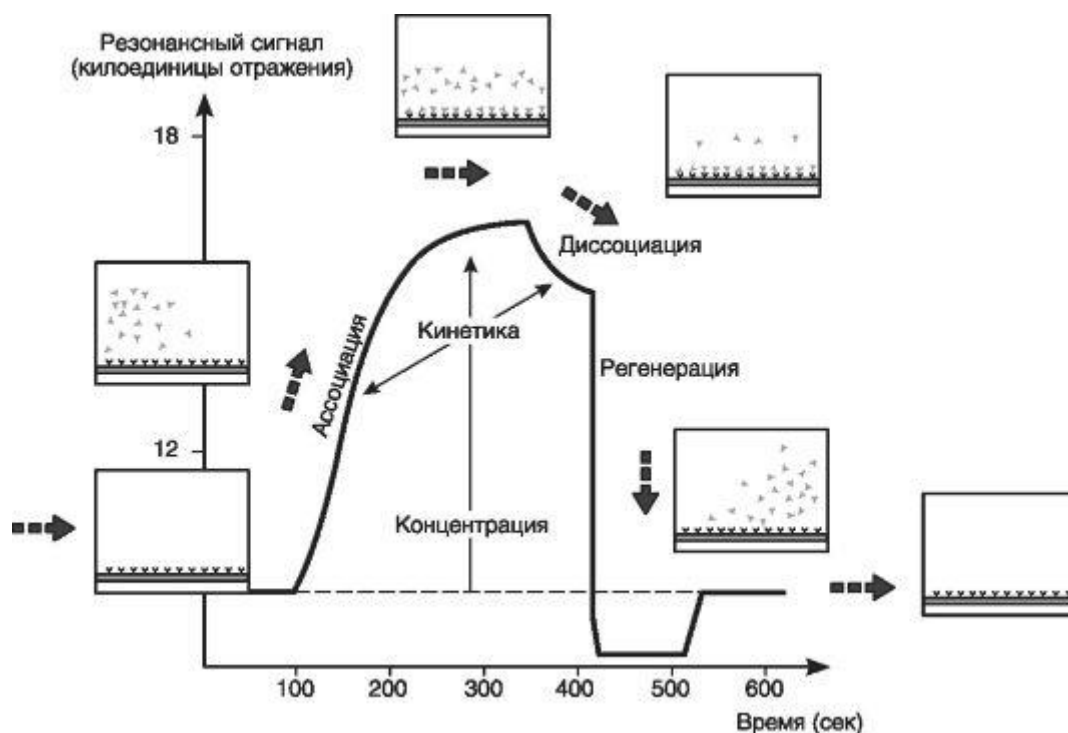


Рис.

63. Схема сенсорограммы (по Баранов В.С., Иващенко Т.Э., 2005)

тельности, комплементарные двум разным аллелям (SNP), фиксируются на стекле. Флуоресцентный ПЦР-продукт, содержащий SNP, гибридизируется на чипе, и образовавшийся гибридационный паттерн анализируется под микроскопом или с помощью специальных компьютерных программ.

- Чипы с фиксацией олигонуклеотидов на агарозной матрице. Они разработаны на основе аллельспецифической гибридизации, но фиксируются при помощи электрического тока на специальной агарозной подложке или матрице. Взаимодействие анализируемых проб с олигонуклеотидными последовательностями происходит под действием электрического поля, которое направляет отрицательно заряженные фрагменты ДНК к положительно заряженному чипу с иммобилизованными на нем последовательностями. При этом концентрация последовательностей в анализируемой пробе локально повышается в непосредственной близости от чипа, что позволяет повысить скорость гибридизации и сократить время проведения анализа.

- Чипы с ферментным процессингом. Они разработаны на основе двух методов: блот-гибридизации и ПЦР. Суть разработки: олигонуклеотиды, примыкающие к SNP, фиксируются на чипе, затем проводится реакция с ДНК-полимеразой и дидезоксинуклеотидами, мечеными разными флуорохромами. В этой реакции каждый зафиксированный на матрице олигонуклеотид становится праймером для ПЦР, которая начинается и заканчивается присоединением к праймеру единственного меченого дидезоксинуклеотида, соответствующего нуклеотиду на матрице. Цвет флуоресценции свидетельствует о том, какой из четырех нуклеотидов вступил в реакцию с олигопраймером.

Таким образом, ДНК-чипы позволяют не только быстро идентифицировать SNP, но и определять их природу (Gut I.G., 2001 г.).

Анализ сцепления болезни с полиморфными маркерами

Анализ сцепления болезни с полиморфными маркерами считается одним из наиболее перспективных методов диагностики. Метод предложен американским генетиком Д. Ботштейном в 1980 г. Используется для определения локусов, сцепленных с моногенными и мультифакториальными заболеваниями в семьях (включая злокачественные опухоли).

Как известно (см. главу 5), на хромосомной карте человека локализовано около 6 тыс. полиморфных генных локусов или полиморфных

ДНК-маркеров. Для анализа обычно используются 300-500 маркеров, распределенных по всему геному, т.е. это метод полногеномного сиквенирования.

По существу, данный метод обеспечивает картирование локуса, сцепленного с заболеванием, и последующий скрининг на мутации в генах-кандидатах, лежащих внутри картированной области или области позиционных кандидатов.

Именно эта стратегия получила название стратегии позиционного клонирования или «обратной генетики» (путь от гена к признаку, см. главу 1).

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) позволяет маркировать нормальные и патологические гены в ядерных семьях и определять их наличие у членов семейной родословной, что имеет большое значение для профилактики наследственной патологии. Наиболее просто идентифицируются мутации, изменяющие длину амплифицированных фрагментов, ибо они легко визуализируются при электрофоретическом анализе.

В частности, протяженные делеции захватывают целые экзоны и могут быть выявлены по изменению длины рестрикционных фрагментов методом блот-гибридизации.

Для выявления протяженных делеций на половых хромосомах разработан простой и надежный вариант диагностики - мультиплексная ПЦР, например, для обнаружения делеций в гене дистрофина при миодистрофии Дюшенна-Беккера.

Другой вариант ПЦР, позволяющий идентифицировать протяженные делеции у гетерозигот, основан на использовании в качестве матрицы для ПЦР кодирующей ДНК (кДНК), полученной путем обратной транскрипции мРНК, изолированной из тканей или культур клеток, экспрессирующих ген дистрофина.

Особое значение метод анализа ПДРФ имеет для пренатальной диагностики наследственных болезней. Например, в случае обнаружения у плода гена миодистрофии Дюшенна-Беккера или гена ФКУ такая беременность должна быть прервана.

Анализ полиморфизма микросателлитных последовательностей

Как сказано выше, микросателлитные повторы - это наиболее удобный объект для применения косвенной ДНК-диагностики. Показано, что кластеры динуклеотидных СА-повторов встречаются в геноме человека с частотой 1 кластер в среднем на 30 тыс. н.п. Причем

во многих кластерах присутствуют от 10 до 30 динуклеотидных пар, и типичное количество аллелей составляет 4-8, что обеспечивает высокую информативность метода анализа полиморфизма микросателлитных последовательностей (повторов) и позволяет определить, с каким из этих повторяющихся аллелей в ядерной семье сцеплено повреждение ДНК и на каком расстоянии от маркера оно находится - все это имеет

большое значение для оценки генетического риска, который определяется частотой рекомбинации между сайтом повреждения и полиморфным генным локусом.

Анализ ассоциации болезни с полиморфными маркерами

Метод анализа ассоциации болезни с полиморфными маркерами основан на сравнении частот встречаемости конкретных полиморфных маркеров у больных с МФЗ и здоровых лиц в одной популяционной группе.

Полиморфными маркерами служат определенные аллели генов и антигены HLA-комплекса. Наиболее частые ассоциации с HLA- антигенами разных классов выявлены при аутоиммунных и инфекционных заболеваниях. Достоверными являются ассоциации с HLA- антигенами при анкилозирующем спондилите (антиген B27), болезни Аддисона (DR3), гемохроматозе (A3), гнездной алопеции (DQW7), псориазе CW6), псориатическом спондилите (B27), рассеянном склерозе (DR3), ревматоидном артрите (DR4).

Наибольшая эффективность метода отмечается при применении в популяциях с высоким уровнем инбридинга, а также в ядерных семьях с разными типами браков.

Анализ идентичных по происхождению аллелей

Метод анализа идентичных по происхождению аллелей или метод IBD, относится к непараметрическим методам, основанным на изучении частоты встречаемости одного и того же аллеля в разных парах родственников (сibsы, дядя-племянник, дед-внук), ибо известно, что среди родственников общие аллели обнаруживаются чаще, чем при их случайной сегрегации. Если идентичный по происхождению аллель сцеплен с МФЗ, то частота его встречаемости в парах больных родственников будет достоверно превышать ожидаемую частоту при отсутствии сцепления, и в этом случае достоверность отличий будет оцениваться с помощью метода кси-квадрат.

FISH-метод диагностики хромосомных нарушений

Основным методом диагностики хромосомных болезней и хромосомных нарушений является цитогенетический метод.

В 90-е годы XX в. для диагностики хромосомной патологии был предложен молекулярно-цитогенетический метод FISH или метод флуоресцентной *in situ* гибридизации.

Данный метод имеет ряд преимуществ в сравнении с методом блот-гибридизации, сочетающейся с радиоактивным мечением. В частности, FISH-метод обеспечивает: более точную локализацию гибридизационного сигнала на хромосоме, проведение анализа за 2-3 дня, безопасность нерадиоактивной метки, одновременное использование не одного, а нескольких ДНК-зондов с различной цветовой окраской.

Вместе с тем, для эффективного применения FISH-метода, например для идентификации хромосом, фрагментов онкогенов, фрагментов гена инсулина и других компонентов хромосом, необходимо наличие коллекции меченных биотином ДНК-зондов, а также дорогостоящей флуоресцентной микроскопической техники.

Методы диагностики врожденных аномалий развития

Молекулярно-генетическая диагностика врожденных аномалий развития направлена на определение их первопричины. Среди генетических причин врожденных аномалий развития могут быть мутации доминантно и рецессивно наследуемых генов, аддитивное действие генов и факторов внешней среды и хромосомный дисбаланс (см. главу 23).

Поэтому для идентификации таких причин применяется большой арсенал вышеперечисленных методов диагностики.

Тестирование неполноценного белка

Основными объектами для тестирования неполноценного белка служат продукты мутантных генов: неполноценные структурные или функциональные пептиды и полипептиды. Сначала из лейкоцитов крови выделяют тотальную мРНК, проводят обратную транскрипцию, амплифицируют специфические экзоны кДНК (метод RT-PCR). Затем встраивают амплифицированную область в экспрессионную бесклеточную систему и анализируют образовавшийся в ней белковый продукт.

Метод RT-PCR особенно эффективен при выявлении мутаций в протяженных генах, например при миодистрофии Дюшенна и нейрофиброматозе типа I.

ГЛАВА 20 МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ

Принципы лечения

Терапия любого наследственного и ненаследственного заболевания направлена на устранение или блокирование причины болезни (этиологическая терапия), механизма болезни (патогенетическая терапия) и симптомов болезни (симптоматическая терапия).

Реализация любого из этих трех принципов является достаточно сложным делом: врачу необходимо учитывать множество индивидуальных особенностей организма больного (включая этнические), а также психологические, экономические и этические последствия для самого больного и его ближайших родственников.

Как сказано в главе 17, одним из признаков наследственной патологии является ее резистентность (невосприимчивость) к терапии, и именно она объясняет преимущественное применение в настоящее время симптоматической терапии, тогда как радикальная этиологическая и патогенетическая терапия большинства форм наследственной патологии практически полностью отсутствует либо слабо разработаны. Поэтому неудивительно, что «застарелая» проблема клинической генетики, связанная с отсутствием этиологической и патогенетической терапии наследственной патологии, ведет к врачебному нигилизму, не говоря уже о неверии самих пациентов в возможность излечиться от такого заболевания.

Вместе с тем, в последние годы в развитых странах мира были получены определенные положительные результаты в этой области и разработаны подходы к радикальной терапии ряда моногенных и мультифакториальных заболеваний человека (см. ниже).

Сначала рассмотрим симптоматическую терапию.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ

Методы симптоматической терапии

Симптоматическая терапия широко применяется при всех формах патологии человека. Она направлена на облегчение состояния больного, снижение темпа прогрессирования и тяжести течения патологического процесса, предотвращение развития осложнений. Такая терапия не предусматривает устранения или блокирования причин и механизмов заболевания, но она и не требует от врача знания особенностей этиологии и патогенеза.

Как правило, симптоматическая терапия дает кратковременный эффект. Поэтому при ее проведении необходимы повторные курсы лечения, эффективность которых снижается по мере прогрессирования заболевания. Для симптоматической терапии общей патологии обычно используются лекарственные препараты, локальные хирургические вмешательства, физиотерапевтические методы.

Например, при болевом синдроме врач применяет анальгетики, при артериальной гипертензии - гипотензивные средства, при эпилепсии - противосудорожные препараты, при аллергических и атопических реакциях - антигистаминные средства и гормоны.

В случае наследственной патологии проводится лекарственная терапия функциональных нарушений разных органов и систем организма, психолого-педагогическая коррекция патологии поведения, интеллектуального дефицита и УО. Например, при БА и МВ назначаются бронхолитики и дыхательная гимнастика, улучшающие легочное дыхание; при прогрессирующих мышечных дистрофиях и митохондриальных болезнях - препараты, улучшающие тканевое дыхание; при скелетных дисплазиях, миопатиях и мукополисахаридозах - электрофорез лекарств, грязевые аппликации и другие физиотерапевтические процедуры; при врожденных аномалиях развития, деформациях суставов и конечностей, моторно-сенсорных нейропатиях и мукополисахаридозах - хирургическая коррекция.

Методы патогенетической терапии

Патогенетическая терапия направлена на устранение или блокирование механизмов наследственной болезни. Она воздействует на обмен веществ в организме и проводится путем коррекции гормональных и метаболических нарушений, связанных с изменениями концентрации и функционирования утилизируемых в клет-

ках и тканях субстратов и их метаболитов, являющихся белковыми и небелковыми продуктами экспрессии патологических генов. Патогенетическая терапия зависит от:

- пути утилизации субстрата - это либо воздействие на путь, по которому субстрат вводится извне (например, с пищей), либо на путь синтеза субстрата в самом организме;
- дефицита продуктов метаболизма субстрата; например, при НБО коррекция путей утилизации субстрата и его метаболитов зависит от того, являются ли симптомы заболевания следствием накопления метаболического продукта - предшественника метаболического блока, или они появляются в результате дефицита конечного метаболического продукта.

Если это следствие накопления метаболического продукта, врачу необходимо решить еще ряд вопросов: синтезируется такой субстрат в организме или поступает с пищей?; Обусловлен патогенез заболевания нарушением ферментативного расщепления субстрата или нарушением его транспорта через слизистую оболочку желудочнокишечного тракта или почки?

В настоящее время в молекулярной медицине широко применяются следующие методы патогенетической терапии.

Диетотерапия

Если утилизируемый субстрат поступает с пищей, а не синтезируется в организме, то основным способом коррекции служит диетотерапия, при которой ограничивается или полностью прекращается поступление в организм продукта, метаболизм которого нарушен в результате дефекта белка-фермента. Примеры: диетотерапия, назначаемая в

первые недели жизни новорожденных, диетотерапия при ФКУ (пища без ФА), диетотерапия при галактоземии (пища без лактозы). Такая диета предотвращает дальнейшее развитие у больных детей механизмов этих заболеваний и, следовательно, их симптоматики.

Другие примеры - тирозинемия (коррекция ФА и тирозином), лейциноз (коррекция лейцином, изолейцином и валином) и т.д.

Устранение метаболического блока и выведение субстрата через обходные метаболические пути

Если утилизируемый субстрат синтезируется в организме, то способы терапии направлены на устранение метаболического блока и выведение накапливающегося субстрата и его продуктов через обходные метаболические пути, минуя основной путь.

Нарушения утилизации субстрата возникают, как правило, в результате мутаций в генах, кодирующих ферменты соответствующих биохимических реакций. Вместе с тем, в ряде случаев метаболический блок может быть обусловлен снижением концентрации или нарушением транспорта коферментов (чаще всего витаминов). В таких случаях терапия направлена на повышение активности ферментов, что может быть достигнуто с помощью:

- приема лекарств - стимуляторов синтеза ферментов ЭР; например, для стимуляции ферментов дыхательных цепей митохондрий при митохондриальных болезнях назначают лекарственные препараты, содержащие филлохинон (витамины К₁ и К₃), янтарную кислоту, рибофлавин, никотинамид, витамины С и Е; эти препараты являются донорами и акцепторами электронов, обеспечивающих антиоксидантный эффект в клетках и тканях организма;
- введения коферментов (витаминов); например, при метилмалоновой ацидемии назначается кобаламин (витамин В₁₂); при гомоцистинурии и пиридоксинзависимых судорогах - пиридоксин (витамин В₆); при недостаточности биотиназы - биотин; при атаксии с дефицитом витамина Е - витамин Е; при витамин-D- резистентном рахите - витамин D; при системной недостаточности карнитина - L-карнитин;
- введения чистого фермента в клетки-мишени; это наиболее эффективный способ патогенетической терапии, но при его применении следует соблюдать ряд условий (стерильность и неиммуногенность вводимых ферментов, необходимость преодоления иммунной защиты организма, точная доставка фермента в клетку-мишень); наибольшие успехи от применения этого способа были достигнуты в терапии лизосомных болезней, сопровождающихся снижением активности ферментных систем лизосом, например, при аутосомно-рецессивной болезни Гоше, обусловленной мутацией в гене фермента - глюкоцереброзидазы, дефицит которой вызывает нарушения расщепления глюкоцереброзида - липида лизосом клеток моноцитарно-микрофагальной системы печени, селезенки и костного мозга (см. главы 4 и 21).

Наилучшим корректирующим препаратом является церезим, содержащий 200 ЕД модифицированного фермента бетаглюкоцереброзидазы, которая расщепляет глюкоцереброзид до глюкозы и церамида. Своевременная терапия этим препаратом предотвращает развитие болезни Гоше и инвалидизацию таких больных.

Другие примеры: индукция фенобарбиталом ферментных систем при синдромах Жильбера и Криглера-Найяра, заместительная ферментная терапия при болезнях Помпе, Фабри, мукополисахаридозах, висцеральных формах лизосомных болезней без поражения ЦНС.

Подавление активности ферментов

Кроме болезней, обусловленных снижением активности ферментов, у человека выделены редкие наследственные заболевания, связанные с повышением активности ферментов. В этих случаях коррекция лекарственными препаратами направлена на подавление активности ферментов; например, при порфирии, сопровождающейся высокой активностью аминолевуленат-синтетазы, назначают гематин, который ингибирует действие этого фермента.

Стимуляция выведения субстрата

Если коррекция дефектного фермента невозможна, то для предотвращения токсического действия проводится стимуляция выведения из клеток и тканей организма самого продукта и его метаболитов. Для этого применяют препараты, связывающие продукт выведения и делающие его нетоксичным, а сам продукт выводится через почки или желудочно-кишечный тракт. Например, при болезни Вильсона-Коновалова, обусловленной мутацией в гене АТРазы, транспортирующей ионы меди к молекулам медьсодержащих белков (этот ген контролирует их экскрецию клетками печени), успешно применяется D-пеницилламин, содержащий сульфгидрильные группы, образующие комплексы с тяжелыми металлами, в том числе медью.

Другой пример - применение L-карнитина при органических ацидуриях.

Возмещение недостающего субстрата

Если заболевание обусловлено дефицитом конечного продукта метаболической реакции, то применяется заместительная терапия, направленная на возмещение недостающего субстрата, например, при гормонодефицитных состояниях. В частности, при врожденном гипотиреозе раннее назначение тироксина полностью предотвращает развитие механизма болезни.

Также успешно проводится заместительная терапия гормоном роста (СТГ) при гипопизарном нанизме или стероидными гормонами при врожденной гипоплазии коры надпочечников.

Другие примеры: введение трипсина (альфа-1-антитрипсиногена) при дефиците трипсиногена (альфа-1-антитрипсина), а также криопреципитация фактора VIII при гемофилии А.

Избирательная индукция, подавление синтеза ферментов

Избирательная индукция синтеза одних ферментов и подавление синтеза других ферментов применяется для терапии подагры, когда индуцируется синтез гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы и, наоборот, подавляется синтез фосфорибозилпирофосфата.

Замещение поврежденных клеток и тканей

В качестве эффективных методов применяются:

- переливание крови - при болезни Фабри, гемофилии, гемоглобинопатиях, ТКИД;
- пересадка почек - при поликистозе почек у взрослых и болезни Фабри;
- трансплантация клеток костного мозга - при ТКИД.

Хирургическое удаление поврежденных тканей

Примерами локального хирургического удаления пораженных тканей являются: колоэктомия при семейном аденоматозном полипозе кишечника, спленэктомия при сфероцитарной анемии, удаление фибром при нейрофиброматозе Реклингаузена.

Внутриутробная терапия и хирургия

Применяется для введения лекарств в ходе инвазивных процедур при пренатальной диагностике или декомпрессии при гидронефрозе и гидроцефалии.

МЕТОДЫ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Этиологическая терапия наследственной патологии занимает особое место в молекулярной медицине, ибо только она позволяет полностью устранить причину болезни. В медицине всегда были примеры радикальной терапии разных болезней человека, например хирургическое удаление первичной опухоли и ликвидация инфекционного агента с помощью антибиотиков.

Однако только во второй половине XX в. в медицине началась новая эпоха, связанная с появлением и развитием молекулярной медицины, внедрением в практику бурно развивающихся техноло-

гий, позволяющих найти способы решения проблем геномного и протеомного здоровья. Благодаря этому появились первые примеры радикальной терапии, направленной на устранение генетической причины наследственного заболевания. Радикальная терапия была нацелена на замену:

- мутантного гена в поврежденной клетке его нормальной копией - область генотерапии;
- поврежденных соматических клеток стволовыми клетками - область клеточной терапии;
- поврежденных тканей новыми тканями - область тканевой терапии.

Кроме этих научных направлений, в молекулярной медицине появились и стали интенсивно развиваться нанотехнологии, нанобиотехнологии и наномедицина.

Последовательно рассмотрим эти области медицинских знаний.

Генотерапия как метод коррекции генетических дефектов

Генотерапия основана на исправлении (коррекции) генетических дефектов путем введения в «больную» клетку молекул специфического лекарства, придающего ей ранее несвойственные нормальные функции. В роли лекарства выступает клонированный ген или искусственно синтезированная молекула мРНК.

В 70-90-е годы минувшего века в развитых странах мира начала осуществляться экспериментальная разработка методов генотерапии, на успех которой ученые сначала возлагали большие надежды. Одновременно в медицине разрабатывались методы клеточной терапии дендритными и стволовыми клетками (см. ниже). В конце этого периода на основе результатов экспериментальных разработок стали проводиться клинические испытания, связанные с лечением сначала двух заболеваний: недостаточности аденозиндезаминазы, обуславливающей развитие ТКИД, и семейной гиперхолестеринемии

Так, в США в 1990 г. 4-летнему ребенку с ТКИД ввели его же лимфоциты, в которых дефектный ген заранее заменили полноценным геном. Положительный эффект наблюдался в течение 6 мес. Спустя 4 года во Франции было опубликовано сообщение об

успехах клеточной терапии взятыми из плаценты стволовыми клетками ребенка с лейкозией.

В этих случаях и генотерапия, и клеточная терапия обеспечивали полную компенсацию нарушенных функций (клеток и тканей соответственно) с помощью:

- либо замены неполноценного (функционально неактивного) гена или аллеля его полноценным аналогом;
- либо включения в функционирование в организме стволовых клеток параллельно с поврежденными клетками.

К 1995 г. было уже 10 больных с ТКИД, которые прошли курс генотерапии в виде повторной внутривенной реинфузии аутологичных лимфоцитов, модифицированных ретровирусом, содержащим ген АДА. В дальнейшем обнадеживающие результаты применения генотерапии и клеточной терапии были получены при лечении больных с гемофилией В, глиобластомой, МВ и семейной гиперхолестеринемией. Затем последовали попытки применения этих методов при лечении многих форм рака, тяжелых инфекционных заболеваний (бешенство, столбняк, СПИД) и миодистрофии Дюшенна. В последнем случае методика обеспечивала введение больному одноядерных миобластов - предшественников многоядерных клеток миофибрилл, образующихся путем слияния миобластов.

В настоящее время значительно расширен спектр заболеваний, при которых предполагается применение методов генотерапии и клеточной терапии. По состоянию на конец 2005 г., на завершающих экспериментальных стадиях или стадиях готовности к клиническим испытаниям находились свыше 1000 уникальных систем для генотерапии и клеточной терапии МБ и МФЗ. Среди всех отобранных для такой терапии заболеваний были выделены основные группы: опухоли (60% испытаний), МБ (12%), сердечнососудистые болезни (8%) и инфекционные болезни (6%), включая СПИД и гепатит В. По экспертным оценкам, шансы на успех составляют 60-70%.

В развитых странах мира разрабатываются три подхода к генотерапии.

Первый подход - компенсация работы в клетке функционально неактивных аллелей гена экспрессией аллелей его дополнительных копий путем замены патологических структур их нормальными копиями (этот путь применяется редко), а также введение нормальных генетических структур при сохранении патологических копий (применяется часто). Оба пути этого подхода используются для исправления дефектов в соматических и половых клетках при

МБ и МФЗ.

Второй подход - подавление экспрессии продуктов дефектного гена путем:

- введения генов-убийц («суицидные гены»), продукты экспрессии которых вызывают гибель избыточно пролиферирующих клеток, не повреждая нормальные клетки;
- блокирования экспрессии онкогенов с помощью антисмысловых нуклеотидных последовательностей, а также генов, продуцирующих антитела против опухолевых клеток и вирусов;
- введения в опухолевые клетки нормальных копий генов-супрессоров опухолевого роста.

Третий подход - повышение иммунореактивности клеток-мишеней или активация иммунной системы организма.

Все три подхода особенно перспективны для лечения онкологических и вирусных заболеваний.

Кроме того, к числу разрабатываемых в этой области других проблем относятся исследования по поиску и созданию противоопухолевых генов; созданию иммунитета против столбняка и других тяжелых инфекций. Например, для обеспечения эффективного иммунного ответа применяются: ген аллоантигена, ген опухолиассоциированного антигена и гены цитокинов.

Для обеспечения эффективного цитотоксического или антипролиферативного ответа применяются гены-супрессоры опухолевого роста или антисенсовые гены.

Сначала рассмотрим примеры генотерапии инфекционных болезней.

Генотерапия инфекционных болезней

В этих случаях основной механизм генотерапии связан с блокировкой экспрессии гена-мишени в самом инфекционном агенте (инфекте). Суть блокировки заключается во введении антисмысловых нуклеотидных последовательностей (антисенсов) как инструмента, тормозящего экспрессию генов инфекта.

Антисенсы - это олигонуклеотиды, блокирующие специфические области генома инфекта, комплементарные уотсон-криковским парам нуклеотидов (АТ-пары и ГЦ-пары) на РНК или ДНК в клетках организма хозяина. Тем самым блокируется способность мРНК инфекта к трансляции и размножению в клетках организма хозяина либо образуется триплетная спираль, препятствующая дальнейшей транскрипции мРНК инфекта.

Установлено, что действие разных антисенсов избирательно проявляется на разных стадиях жизненного цикла инфекта (либо сразу на нескольких стадиях). Например, при СПИДе наблюдается дей-

ствие антисенсов на стадиях 3 и 4; действие рибозимов (это антисмысловые фрагменты РНК с каталитической активностью) - на стадиях 4 и 5, что позволяет гидролизовать мишень и значительно повысить эффект в сравнении с таковым у антисенсов; действие трансдоминантных негативных белков (ТДБ) - на стадии 6.

Таким образом, в ходе антисенс-терапии обеспечивается ингибирование сразу нескольких стадий жизненного цикла инфекта, а применение генетических вакцин обуславливает еще и высокий уровень иммунной защиты с минимальным риском развития осложнений.

Генетическая вакцина - это новый класс антимикробных генотерапевтических препаратов. В них содержатся самые маленькие структурно-функциональные единицы, сохранившие свойства и специфичность исходных антигенов за счет оставшегося в каждой из них участка связывания с антигеном.

Генетическая вакцина при ВИЧ-1 блокирует стадию 4 жизненного цикла вируса, а сочетанное с ней действие антисенсов (на стадиях 1 и 2) повышает устойчивость Т-лимфоцитов к вирусу.

Следует отметить, что в современной биоинформатике, которая (наряду с геномикой и протеомикой) является основой молекулярной медицины, определен алгоритм для создания антисенсов, принципиально отличающийся от традиционного подхода к разработке лекарств. Этот алгоритм базируется на сходстве нуклеотидных последовательностей ДНК или РНК инфекта и генома человека; требования по выбору гена-мишени и клетки-мишени для такой терапии обязательны.

Сейчас уже получены: ген репликации вирусной ДНК (Е2-ген папилломавируса), ранние гены ЦМВ и гены белков оболочки ВИЧ-1 (gag-ген ВИЧ-1).

Вместе с тем, выделены две проблемы, связанные с разработкой средств доставки антисенса в клетку-мишень:

- использование определенного типа клеток для целевой доставки препарата, что снижает неспецифическое побочное действие на организм хозяина;
- снижение стоимости препарата за счет введения аутоотрансплантатов (клеток крови или костного мозга, взятых *ex vivo*).

К сожалению, адекватное решение этих проблем пока не найдено. Поэтому стали разрабатываться новые средства доставки антисенсов. Например, применяют физические факторы - катионные липиды; вирусные факторы - липосомные технологии.

Оказались эффективными генные технологии, используемые в иммунотерапии и также основанные на генетических вакцинах, обеспечивающих быстрое достижение высокого уровня иммунной защиты, сохраняющих напряженность иммунитета в течение длительного времени и его видоспецифичность, а также дающих минимальный побочный эффект.

Еще один способ генотерапии инфекционных заболеваний - это генетическое конструирование цитотоксических Т-лимфоцитов, основанное на восстановлении иммунной системы организма за счет использования собственных иммунных клеток (CD4, CD8, CD34) и антигенпрезентирующих клеток, инфицированных тем или иным агентом (например, ВИЧ и вирусом простого герпеса - HSV).

Кроме того, для лечения несистемных локализованных болезней была предложена тканеспецифическая генотерапия, основанная на способности некоторых вирусов к выраженному тканевому тропизму. Например, вирус простого герпеса избирательно проникает в нервные клетки, где латентно сохраняется в течение многих десятков лет.

Среди заболеваний, к которым применима тканеспецифическая генотерапия, значатся: болезнь Паркинсона, злокачественная глиома, мукополисахаридоз VII типа (болезнь Слая) и хорей Гентингтона.

Вернемся к «суицидным генам» (см. выше), которые были созданы с применением генно-инженерных технологий как гены, производящие токсические белки, уничтожающие только инфицированные клетки.

Например, так были получены: ген, экспрессирующий А-цепь дифтерийного токсина (DT-A), ген цитозиндезаминазы и ген HSV- тимидинкиназы. Последний ген вызывает апоптоз, когда клетка «лечится» аналогом антигерпетического нуклеозида - ганцикловира применяемым для лечения рака простаты.

Генотерапия опухолей

Ряд опухолей вызывается вирусами. Поэтому здесь были использованы подходы и методы генотерапии инфекционных заболеваний. Так, в качестве антигенпрезентирующих клеток оказалось возможным использование трансфицированных разными векторами опухолевых клеток, которые стали применяться для уничтожения метастазов на стадиях несформированных узлов и даже единичных клеток. Например, получен препарат гендицин, с помощью которого больным с разными опухолями вводится ген p53, продукты экспрес-

сии которого способствуют апоптозу. Доставка этого гена возможна при помощи аденовирусного вектора.

Генотерапия в трансплантологии

Решение генотерапевтических проблем в трансплантологии направлено на создание эффективных методов, предупреждающих развитие острого и хронического воспаления и отторжение трансплантата с помощью ряда генов.

Перспективными в этом отношении считаются: гены блокаторов костимуляторов сигнала (CTLA-41q, CTLA-4); гены, связанные с хроническим отторжением трансплантата (молекулы внутриклеточной адгезии 1 и гены синтазы N2 и c-myb); гены цитокиновых иммуносупрессоров; протоонкоген c-myb, гены MNC-1.

Подведем некоторые итоги.

- Для успешной реализации задач генотерапии наследственной патологии обеспечено контролируемое *in vitro* и *in vivo* введение генетического материала в клетки человека (клетки крови, кожи, мозга, мышц, печени) с помощью разных векторных и безвекторных средств доставки наследственной информации. Разработаны два способа доставки: *способ in vitro*, перенос нормальных генов в культуру клеток человека, после чего трансдуцированные клетки вводятся в организм хозяина; *способ in vivo*, доставка нормального гена непосредственно в организм хозяина путем прямого переноса с помощью «голой» (свободной от белков) флуоресцентномеченой плазмидной ДНК или векторных систем. При втором способе используются следующие методики:

- гидродинамический шок;

- насыщение ДНК полианионом (введение гепарина, декстрансульфата); физическая доставка (электропорация, баллистическая трансфекция или «генное ружье», «бомбардировка» клеток молекулами ДНК, связанными с металлами или другими химическими элементами - Au^+ , Ca^{++} ; векторные системы на основе вирусов, липосом и катионных полимеров).

- Проблемы генотерапии наследственной патологии тесно связаны с решением трех задач. Это разработка способов и средств доставки нормальных генов и геномов в поврежденные клетки и ткани; разработка способов регистрации уровней экспрессии генов и геномов, доставленных в поврежденные клетки и ткани; создание оптимальных условий для регулируемой экспрессии доставленных генов и геномов.

- Созданы оптимальные условия для регулируемой экспрессии генов, вводимых в клетки (но пока еще не геномы!).

- Выяснено, что кроме структурного гена (в его полноразмерной форме) или гена, полученного в виде кДНК, в клетку можно вводить регуляторные последовательности нуклеотидов, имеющие ориентацию, зависящую от целей генотерапии.

- Разработаны два основных метода этиологической терапии. Первый метод - метод химеропластики, добавления в культуру делящихся клеток фрагментов геномной ДНК (химеропластов). Этот метод основан на механизме генной конверсии в клетках, полученных от больного. Суть метода состоит в *in vitro* гибридизации ДНК больного с короткими антисмысловыми последовательностями РНК, комплементарными местам сплайсинга в первичном РНК-транскрипте, что ведет к проскальзыванию петли сплайсинга и удалению мутантных экзонов из мРНК. По этой причине данный метод называют также *методом перепрыгивания экзонов*. Второй метод - метод введения

химических стимуляторов, специфически активирующих нормальные гены, являющиеся гомологами мутантных генов. Этот метод применяется для лечения серповидноклеточной анемии и миодистрофии Дюшенна- Беккера. При втором заболевании активируется ген мышечного белка - утrophина, локализованный на коротком плече хромосомы 6 (6p24).

- Выделены приоритетные подходы к внедрению этиологической терапии. Среди них клонирование соматических клеток; получение чистых линий трансгенных животных; разработка векторных систем на основе вирусов, содержащих человеческие гены, встроенные в определенные участки вирусного генома, а также на основе аденовирусов, ретровирусов и лентивирусов с высокой эффективностью трансфекции в геном хозяина, длительной экспрессией и низкой иммуногенностью. Кроме того, разработаны векторы на основе липосом (липидные пузырьки с фрагментами ДНК) и катионных полимеров (полилизин, полиэтиленамин, лизин-гистидиновый полимер).
- Установлено отсутствие универсального вектора для доставки генетического материала вне связи с конкретным наследственным заболеванием.

Регенераторная медицина

Использование клеток, выделенных из разных органов и тканей, для лечения наследственных заболеваний получило название регенераторной медицины. В ней два направления: клеточная и тканевая терапия, или инженерия.

Клеточная терапия

Клеточная терапия основана на выделении из организма специфических клеток, придании им *in vitro* (с помощью генетического конструирования или ряда сигнальных молекул) необходимых свойств и последующем введении в организм *in vivo*. Иными словами, клеточная терапия строится на основе инженерии, предусматривающей введение в клетку или удаление из нее конкретного гена.

Генетические (инженерные) манипуляции осуществляются с помощью методов молекулярной биологии, с использованием физического воздействия на наследственный материал человека. В результате такого воздействия происходит восстановление функции дефектного гена или внедрение нового гена, который добавляет клетке-мишени новые функции либо регулирует в ней активность других генов.

Потенциальный успех клеточной инженерии зависит от способности гена адекватно функционировать в клетке. Известны два подхода по доставке гена в клетку: вирусные и невирусные векторы; предварительное выделение клеток (лимфоциты, фибробласты, стволовые клетки), в которые вводится необходимый ген. После этого клетки наращиваются, тестируются и поставляются пациенту обратно.

Главными инструментами клеточной инженерии являются дендритные клетки и стволовые клетки (СК).

Дендритные клетки

Дендритные клетки (DCs-клетки) обладают способностью представлять антигены наивным Т-лимфоцитам и таким образом участвуют в определении направленности иммунных реакций (модулируют их) при опухолях, аутоиммунных и инфекционных заболеваниях.

Кроме того, DCs-клетки являются векторами и мишенями для изменения иммунного статуса организма.

Впервые DCs-клетки (в коже) описаны П. Лангергансом в 1868 г. Они представляют собой крупные клетки неправильной формы с ветвящимися отростками, проникающими между другими клетками, имеют хорошо развитый аппарат Гольджи, содержат в своей

цитоплазме большое количество везикул с овальной и неправильной формой ядер и обнаруживаются во всех тканях организма, где обычно представляют небольшой клеточный пул. В качестве антигенпрезентирующих DCs-клетки стали объектом изучения только спустя 105 лет - в 1973 г.

Выделено несколько популяций DCs-клеток, изучены их морфология и экспрессия в них молекулярных маркеров, а также функции, зависящие от стадии развития клеток, уровня их активации и степени дифференцировки.

В развитии DCs-клеток выделены следующие стадии.

- *Первая стадия* - предшественники клеток костного мозга или небольшая фракция CD34⁺ кроветворных клеток, присутствующая в костном мозге и периферической крови.

- *Вторая стадия* - предшественники DCs-клеток, циркулирующие в крови и лимфе; дают начало незрелым тканевым DCs-клеткам; их две субпопуляции, составляющие около 1% мононуклеарных клеток крови.

- А. Экспрессирующие маркеры миелоидных клеток, созревающие в ответ на воспалительные стимулы (например, в ответ на липополисахарид или TNF-альфа) - это DCs-клетки 1-го типа, происходящие либо из CD14⁺-моноцитов, либо из CD11c⁺-клеток. Они дифференцируются в незрелые DCs-клетки и макрофаги, дают начало эпидермальным клеткам Лангерганса и интерстициальным DCs-клеткам, известным также под названием тканевых DCs-клеток (дермальные клетки и макрофаги), которые локализуются в дерме и большинстве внутренних органов, включая легкие и сердце, где экспрессируют множество разных факторов.

- Б. Лимфоидные DCs-клетки 2-го типа, IFN-альфапролиферирующие клетки, созревающие в ответ на IL-13 и CD40L.

- *Третья стадия* - незрелые антиген-захватывающие DCs-клетки. Они располагаются в разных тканях, где разными путями захватывают антигены (макропиноцитоз, рецептор-опосредованный эндоцитоз, фагоцитоз, через TLRs-рецепторы и поверхностные рецепторы).

- *Четвертая стадия* - зрелые антиген-представляющие DCs-клетки. Они мигрируют во вторичные лимфоидные органы через высокий эндотелий венул лимфатических узлов или поступают непосредственно из кровяного русла.

В настоящее время описаны методики выделения и культивирования дендритных клеток из кожи, миндалин, печени, селезенки и крови. Проблемы и перспективы использования DCs-клеток при наследственной патологии имеют свои особенности.

Остановимся на особенностях иммунотерапии онкологических заболеваний с помощью дендритных клеток.

Первая особенность - важность выбора оптимального антигена, против которого следует вызвать иммунный ответ. Дендритные клетки способны мигрировать через ткани и проникать в опухоль, где захватывают опухоль-специфические антигены, переваривают их и резекспрессируют для эффективной индукции клеточноопосредованного иммунного ответа.

Вторая особенность - DCs-клетки, как правило, применяются для терапии некурабельных больных, имеющих множественные метастазы и не поддающихся лечению традиционными методами. Например, использование DCs-клеток показано при В-клеточной лимфоме, меланоме, раке грудной железы, легких, поджелудочной железы, простаты, толстого кишечника и яичника, почечноклеточном раке.

Кроме того, имеются данные о широком использовании генетических вакцин на основе DCs-клеток при опухолях ЦНС.

Стволовые клетки

После выделения в 1998 г. потенциально плюрипотентных (многофункциональных) СК в регенераторной медицине открылись новые горизонты для их широкого применения. Известны два типа СК: эмбриональные (ЭСК) и соматические (ССК). И те, и другие имеют как преимущества, так и недостатки.

В частности, ЭСК - это, с одной стороны, возможность бесконечной пролиферации симметричным делением, выраженная клоногенность и плюрипотентность.

С другой стороны, ЭСК - это иммунологическая несовместимость при пересадке реципиенту, множество этических проблем (см. ниже), невозможность обнаружения генетических дефектов до их пересадки, несоответствие условий клеточной дифференцировки *in vivo* и *in vitro*, отсутствие убедительных доказательств эффективности и безопасности применения.

В свою очередь, ССК - это, с одной стороны, легкая идентификация и выделение из периферической крови и костного мозга взрослых пациентов, а также из пуповинной крови новорожденных младенцев,

отсутствие этических проблем, пластичность или мульти- и унипотентность, способность поддерживать дифференцировку в тканях взрослого организма в течение всей жизни, хорошее сохранение при лабораторных манипуляциях.

С другой стороны, ССК - это малочисленная популяция недифференцированных клеток, обнаруживаемых в дифференцированных специализированных тканях, низкий пролиферативный потенциал с асимметричным делением, ограниченная способность к росту в культуре. Кроме того, для ССК нет стандартных методов длительного поддержания и коммитирования (преобразования) из дифференцированных тканей в зрелые клетки других тканей, нет надежных маркеров для их идентификации в разных тканях.

В последние годы большие надежды связаны со стволовыми гемопоэтическими клетками, которые используются в качестве клеткамишеней в 40% случаев клеточной терапии на основе ССК, ибо эти клетки способны к самоподдержанию, что снижает риск элиминации гена, введенного с их помощью.

Определенные надежды связаны с другой разновидностью ССК - миобластами: ими предполагается лечить наследственные миопатии.

Тканевая инженерия

Тканевая инженерия является основным инструментом экзогенного управления молекулярными процессами в разных тканях. Разработка и внедрение ее методов стали необходимыми для понимания тонких механизмов клеточной дифференцировки, пролиферации и миграции, а также функционирования тканей.

Отметим, что сначала в молекулярной медицине появились возможности для понимания механизмов, регулирующих метаболизм внеклеточного матрикса. При этом учитывались особенности межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий и их роль в поддержании гомеостаза и целостности ткани. И именно эти особенности стали основой для разработки комплексных клеточных биоматриксных систем вне организма - тканевых эквивалентов. Благодаря параллельному развитию молекулярной медицины, биотехнологий, химии полимеров и разработке инженерных принципов конструирования тканевых эквивалентов удалось создать трехмерные функциональные анатомические единицы, обусловившие появление и развитие тканевой инженерии, использующей для замены

поврежденных (пораженных) тканей и органов их инженерные аналоги.

Новые инженерные конструкции построены с учетом принципов и методов, позволяющих восстанавливать, поддерживать и улучшать функции пораженных тканей и органов.

Показано, что новая инженерная ткань хорошо интегрируется в организм пациента, осуществляя в нем постоянное специфическое лечение. Сегодня при создании новых инженерных тканей применяется множество подходов. Рассмотрим основные из них.

Первый подход - это дизайн и выращивание ткани *in vitro* с последующей ее имплантацией для восстановления или замены поврежденной ткани (например, пересадка компонентов кожи при лечении ожогов или введение кожных эквивалентов, восстанавливающих эпителиально-стромальные дефекты с помощью добавления культивированных фибробластов дермы, растущих в трехмерном коллагеновом геле).

Стандартной клеточной моделью кожи человека служит двухмерная клеточная система, представленная дермальным эквивалентом (это кожные фибробласты, растущие в трехмерном коллагеновом геле) и эпидермальным эквивалентом (это кератиноциты, дифференцирующиеся на поверхности дермального эквивалента).

Данная модель широко используется в биологии, дерматологии (лечение инфекционно-аллергических болезней кожи), косметологии (апробация косметических средств), офтальмологии (реконструкция роговицы глаза для восстановления специализированного покрова), травматологии и хирургии (заживление ран), трансплантации (пересадка кожи), фармакологии (доклиническая апробация лекарств).

Второй подход - это имплантация клеток, содержащих молекулы и белковые факторы, индуцирующие репарацию (см. главу 11) или регенерацию функций поврежденной ткани.

Этот подход основан на технике выделения клеток, добавлении к ним определенных сигнальных молекул (подобных факторам роста) и переносе этих клеток в биоматериалы, обеспечивающие регенерацию тканей (например, добавление стимуляторов роста костной ткани при болезнях периодонта в стоматологии).

Третий подход - это использование внутреннего потенциала тканей и органов для восстановления поврежденных функций. Этот подход основан на технике выделения СК, которые имплантируются

пациенту либо непосредственно в суспензии, либо в структурном матриксе, либо после преобразования *in vitro*.

Четвертый подход - это метод культивирования клеток на микроносителях. Данный метод был разработан с целью оптимизации (модификации) технологии выращивания клеток и увеличения сроков жизни трансплантата (инженерной ткани). К микроносителям

относятся коллагеновые микросферы, поверхности пленок разного биохимического состава, пересаживаемые на поврежденные участки кожи.

В настоящее время одной из трудноразрешимых проблем тканевой инженерии является ограниченность выбора субстрата (клеточного источника) из, казалось бы, широкого спектра материалов, перспективных для тканевой инженерии.

Среди таких материалов:

- биосовместимые и биodeградируемые (биорезорбируемые) синтетические полимеры;
- макромолекулярные полимеры, например гиалуроновая кислота, стабилизированная бензиловой этерификацией;
- модифицированные полунатуральные природные соединения;
- природные полимеры (гликопротеиды, полисахариды);
- целостные ткани для восстановления хряща и роговицы. Следует отметить, что самым доступным клеточным субстратом

для человека оказалась богатая белками плазма крови, например адгезивный субстрат из тромбина и фибриногена, стабилизированный протеазным ингибитором - апротинином.

Другая трудная проблема тканевой инженерии состоит в том, что применение того или иного подхода имеет свои «за» и «против». Например, на безусловную неоспоримость выбора аутогенного источника указывает отсутствие на него иммунной реакции организма, хотя при этом возможен риск инфицирования.

Наоборот, лимитирующими факторами могут стать соматические болезни пациента, его возраст, отсутствие возможности получения от него адекватного биологического материала (необходимое количество аутологических клеток).

Нанотехнологии, нанобиотехнологии и наномедицина

Слово «нано» происходит от греческого «гно», «карлик». Сначала рассмотрим нанотехнологии: их объекты - объекты нанометрового размера в пределах от микродо ультра-, от 10^{-3} до 10^{-18} м. Аттомолярный уровень начинается от 10^{-18} м.

Нанотехнологи оперируют нанообъектами (наноматериалами), к которым относятся: биологические мембраны, жидкие кристаллы, липосомы, мицеллярные системы и микроэмульсии, надмолекулярные ансамбли и конструкции, нанокомпозиты, нанотрубки, пористые материалы, тонкие пленки и поверхностные слои, ультрадисперсные порошки, фотонные кристаллы, фуллерены.

Применение нанотехнологий и наноматериалов - это новые возможности в электронике, химии, энергетике, биологии, медицине, сельском хозяйстве и других отраслях.

В свою очередь, биомолекулярные нанотехнологии, нанобиотехнологии - это новое направление в биологической науке, позволяющее анализировать живые системы на молекулярном уровне с помощью наночастиц.

Переход от «микро» к «нано» - это не количественный, а качественный переход от манипуляции отдельным химическим веществом до манипуляции его молекулами и атомами. Благодаря своим «ультрамикроскопическим» размерам наночастицы приобретают новые физикохимические свойства и функции, существенно отличающиеся

от тех функций, которыми обладают микрочастицы и составляющие их молекулы и атомы, т.е. частицы большего размера.

Нанобиотехнологии - это связующее звено между живой и неживой материей и возможность для создания нанобиоустройств, позволяющих понять малые компоненты живого и неживого и оценить их важную роль в функционировании клетки и организма. Неудивительно, что на основе нанобиотехнологий появилась и стремительно развивается наномедицина.

Направления развития наномедицины

Чем привлекательна наномедицина, какое значение она имеет для молекулярной медицины? *Во-первых*, это новая эпоха развития молекулярной медицины, это ее дальнейший путь (уровень) развития, путь перехода к медицине субмолекулярной, атомной и субатомной, т.е. медицине ближайшего будущего, идущей на смену существующей медицине и связанной с внедрением в практику ранее неизвестных врачам нанобиотехнологий, разрабатываемых с целью эффективной диагностики и лечения наследственных и ненаследственных болезней человека. *Во-вторых*, это создание атомно-силовых, оптикобиосенсорных, нанопроводных и нанопоровых подходов и методов диагностики, диагностических наноматериалов, позволяющих значительно повысить чувствительность, точность и существенно сокра-

тить время диагностики разных заболеваний. *В-третьих*, это новые возможности для постоянного и выборочного наблюдения (слежения), исправления, конструирования и контроля за управлением биологическими субмолекулярными и ультрамолекулярными системами человека, формирующими физические и химические реакции, происходящие на геномном и протеомном уровнях организации живой материи. *В-четвертых*, это проникновение в почти не изученную область организации неживой материи, которая, безусловно, оказывает значительное влияние на геномное и протеомное здоровье человека. *В-пятых*, это использование наноустройств, наноструктур и наночастиц с терапевтическим действием, способных выполнять сложнейшие микрооперации в клетках и тканях: от обнаружения и мониторинга поведения патологических генов (микроорганизмов) до их уничтожения, а также восстановления наследственного материала поврежденных клеток и тканей, обеспечения необходимыми веществами и придания им ряда других функций.

В настоящее время выделен ряд направлений развития нанобиотехнологий, связанных с наномедициной. Разрабатываются:

- нанодиагностикумы или нанобиосенсоры в диагностике (наноаналитическая геномика и протеомика);
- молекулярные нанополупроводные и нанопоровые детекторы в диагностике, счетчики молекул и сиквенс-анализаторы ДНК;
- наночастицы - контейнеры для доставки лекарств и наночастицы - лекарства;
- синтетический геном на основе молекулы ДНК как самовоспроизводящейся системы;
- нанотехнологии в регенеративной медицине;
- медицинские нанороботы, имитирующие функции разных клеток.

Кратко рассмотрим особенности некоторых из этих направлений.

Нанодиагностикумы и нанобиосенсоры

Существующий в протеомике концентрационный барьер для обнаружения и идентификации белковых молекул в биологическом материале составляет 10^{-12} М ($1 \text{ нм} = 10^{-9}$ М), тогда как методы радиоиммунного анализа (РИА) и иммуноферментного анализа (ИФА) имеют чувствительность 10^{-12} - 10^{-15} М.

Дальнейшее развитие протеомики определяется разработкой и внедрением методов идентификации белковых молекул в диапазо-

не концентраций от 10^{-3} до 10^{-20} М. Причем такая чувствительность должна достигаться в многокомпонентном биологическом материале, содержащем сотни тысяч разных белков.

Показано, что использование нанотехнологий при применении электрофоретического и хроматографического методов разделения белков позволяет снизить объем исследуемого материала на несколько порядков и существенно сократить время для его анализа.

Например, с помощью наноэлектрофореза разделение сложной смеси на 20 белков с молекулярной массой от 10 до 100 кДа осуществляется всего за 15 с, а при проведении стандартного 2D-электрофореза (см. главу 19) - несколько часов.

Одним из способов выделения и концентрирования белков из сложных смесей стал их селективный захват и концентрирование на поверхности нанобиочипов за счет межмолекулярных взаимодействий, а также за счет биосенсоров на основе биоспецифического фишинга. Эти методы позволяют выделять в биологической жидкости белки с низкой концентрацией и одновременно повышать их концентрацию с последующей идентификацией на масс-спектрометре LC/MS. При этом чувствительность достигает аттомолярного уровня.

В настоящее время широко используются оптические биосенсоры на базе нанотехнологических устройств. Их работа основана на эффектах поверхностного плазмонного резонанса (см. главу 19) и резонансного зеркала (акустические биосенсоры), позволяющих в течение нескольких секунд регистрировать в реальном времени образование комплексов макромолекул с высокой концентрационной чувствительностью (до 10^{-12} М).

Перспективная область применения нанобиосенсоров - клиническая диагностика социально значимых протеомных болезней, например, гепатита В и С. В этом случае полученные данные совпадали с данными ИФА (около 10^{-9} М), но быстрота анализа составляла всего 5-8 мин и сохранялась возможность многократного (до 150 раз) использования одного и того же биочипа.

Интересными также стали подходы к анализу белок-белковых реакций без использования радиоактивной метки. Например, один из таких подходов основан на прямом превращении взаимодействия белков в информационный сигнал и его реализации на компакт-дисках к персональному компьютеру. В этом случае биочипом стал стандартный компакт-диск с нанесенными на нем биологическими полями. Подобный подход применен для ком-

плексообразования стрептавидина и биотина, конканавалина А и альфа-маннозида.

Одним из перспективных подходов стало создание наносенсоров, способных работать в живом организме. Например, был создан отечественный микросенсор для определения содержания глюкозы и инсулина в крови. Это микроустройство представляет собой чип размерами 5-8 мм, вживляемый в тело пациента и регистрирующий уровень глюкозы в крови путем преобразования биохимической реакции в электрический сигнал. В последние годы на его основе разработан принципиально новый тип имплантируемого

под кожу микросенсора для фотометрического контроля уровня глюкозы на основе углеродных нанотрубок, имеющих специфическое флуоресцентное покрытие. Такой наномикросенсор не только контролирует, но и оптимизирует уровни глюкозы и инсулина в крови.

Молекулярные нанодетекторы

Известные концентрационные детекторы имеют предел чувствительности до 10^{-15} м, тогда как молекулярные нанодетекторы способны обнаружить и идентифицировать даже отдельные молекулы и их комплексы. Среди таких детекторов атомно-силовые сканирующие микроскопы, криомасс-детекторы, нанополупроводные и нанопоровые детекторы. С их помощью установлено, что единичные молекулы являются «локальными репортерами» микроокружения, что важно для исследования гетерогенных систем и анализа конформационных состояний, связанных со сборкой, ферментативной активностью и другими событиями в клетке.

В свою очередь, с помощью сканирующей оптической микроскопии (волноводная техника) или метода широкополевого (ближнего и дальнего) сканирования можно наблюдать ДНК-полимеразную активность единичной молекулы. Например, применение широколевой микроскопии с полным внутренним отражением позволило проследить за реакцией каталитического расщепления АТР одиночной молекулой миозина, а также увидеть прохождение одиночной молекулы через единичный трансмембранный канал.

В последние годы существенно возросло число работ по анализу единичных молекул с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) и сканирующей туннельной микроскопии (СТМ). В частности, АСМ-технологии позволяют визуализировать под микроскопом белки в условиях, близких к нативным. Именно так были получены изображения:

- мембранного белка цитохрома Р4502В4, встроенного в фосфолипидный бислой мембраны;
- водорастворимых белков и их комплексов для иммуноглобулинов, ферритина, фосфорилазы и фосфорилпротеинкиназы;
- иммунных комплексов антиген-антитело для диагностики инфекционных болезней, рака и сердечно-сосудистых заболеваний.

Наночастицы как диагностикумы и лекарства

В молекулярной медицине используются наноматериалы, повышающие эффективность имеющихся лекарственных препаратов, позволившие создать новые лекарства - фуллерены, представляющие собой аллотропную форму углерода C^{60} с одинаковой длиной двойных и одинарных бензольных связей.

Доказано, что фуллерены и их производные восстанавливают повреждения в клетках, возникшие в результате окислительных процессов, и ингибируют апоптоз за счет взаимодействия с радикалами кислорода, образующимися в клеточных мембранах. Причем фуллерены способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, что позволяет использовать их для лечения нейродегенеративной болезни Паркинсона. Кроме того, синтезированы фуллерены с выраженными противовирусными свойствами. Они угнетают репликацию вируса гриппа на поверхностных рецепторах клеточных мембран.

Также отмечена противовирусная активность фуллеренов и их производных в отношении ВИЧ.

Получены конъюгаты наночастиц золота с антителами против рецептора антидермального фактора роста (используются для диагностики рака): они не соединяются с нормальными клетками, но соединяются с клетками опухоли.

Разработаны наночастицы и нанокапсулы на основе кремния - они применяются для брахитерапии неоперабельного рака печени. При этом разрушение опухолевых клеток происходит за счет действия на них радиоактивного фосфора ^{32}P в нанокапсулах.

Наночастицы как транспортные системы для доставки лекарств

Известно, что лекарства, снабженные системами доставки, имеют ряд преимуществ по сравнению с обычными лекарствами. Они нетоксичны, биodeградируемы, не вызывают аллергических реакций, имеют высокое сродство к биологическим мембранам. Это, как правило, коллоидные инертные транспортные системы.

В мире разработано множество сертифицированных наносистем для доставки (переноски) лекарств, а на фармацевтическом рынке насчитывается несколько десятков лекарственных препаратов, транспортируемых такими системами. В основном это противоопухолевые препараты, снабженные фосфолипидной системой транспорта (мицеллы, липосомы). В их числе анамицин, винкристин, дауномицин, доксорубин и третионин.

Следует отметить, что наночастицы на основе полимеров значительно более стабильны в биологических жидкостях при длительном хранении, но в отличие от липосом могут давать побочные эффекты при введении в организм. Например, к ним относятся биodeградируемые наносферы на основе полилактатов (ПЛА), полилактидекогликолида (D,L-ПЛГА) и других биосовместимых полимеров (сложных полиэфиров альфа-цианоакриловой кислоты).

Вместе с тем, с помощью наносфер наиболее эффективно транспортируются такие лекарства, как липокаин, тамоксифен, циклоспорин и др.

Медицинские нанороботы

Молекулярная медицина вступила на путь эволюционного перехода к атомной медицине и наномедицине, что рано или поздно приведет к разработке и применению в работе врача медицинских нанороботов, которые будут выполнять «ремонт» и уничтожение поврежденных клеток на молекулярном и субмолекулярном уровнях. Примерами таких нанороботов уже сегодня служат аналоги клеток крови - аналоги эритроцитов, фагоцитов и респирицитов. С другой стороны, в молекулярной медицине уже появились возможности применения генохирургии, которая постепенно сменит генотерапию. Суть генохирургии заключается в том, что с помощью контролируемого врачом наноробота (например, «лазерного скальпеля») в больной клетке будет выделен и удален мутантный ген и вместо него будет вставлен нормальный ген. Такая возможность продемонстрирована в 2005 г. в работе N. Shen et al.

В самых оптимистических прогнозах зарубежные наномедицинские технологи предполагают, что уже в ближайшие два десятилетия медицинские нанороботы станут обязательным инструментом оснащения врачебного кабинета.

Этические проблемы молекулярной медицины

Использование в молекулярной медицине нанобиотехнологий отражает начало ее перехода к медицине субмолекулярной, атомной и субатомной, т.е. медицине ближайших десятилетий.

Параллельно будет развиваться биомедицинская этика. Известно, что общая этика - это свод (совокупность) норм и правил, регулирующих взаимоотношения между отдельными людьми и их группами. В свою очередь, совокупность норм и правил поведения врача и больного - это биомедицинская этика, которая (как и общая этика) складывается из трех основных компонентов (частей). Среди них - наблюдаемые у всех эукариот врожденные способности (первая часть), доктринальная (идеологическая) и конвенциональная (договорная) составляющие (соответственно вторая и третья части).

Правила, составляющие вторую и третью части, распространяются только на человека. Они складываются у разных рас, наций, народов и народностей на основе разных соматических, психических (интеллектуальных и эмоциональных) и репродуктивных особенностей, а также обычаев. Эти разные особенности и обычаи формируют общую этику поведения людей, изменяют их соматическую и психическую, оказывают влияние на процесс репродуктивного воспроизводства, на будущее потомство.

В общей этике выделяют религиозные, наднациональные, национальные, региональные и этнические компоненты.

Признанными постулатами общей этики (равно как и биомедицинской этики) являются следующие.

- Автономия личности или право человека самостоятельно решать все вопросы, касающиеся состояния его соматического, психического и эмоционального.
- Равный и справедливый доступ каждого человека к общественным благам, необходимым для его жизни в обществе.
- Гиппократовское «не вреди» при воздействии врача на конкретного больного, обязательное непричинение ему какого-либо вреда, а наоборот, сотворение для него блага.

В молекулярной медицине обязательными элементами воздействия на конкретного больного (субъекта) стали МГК и тестирование человека, выявление определенных особенностей его наследственного материала (состояние генома) и фенотипических особенностей его организма (состояние фенотипа), в том числе тестирование психического, соматического и репродуктивного здоровья. В случае, когда речь идет не о воздействии на одного больного, а воздействии одновременно на совокупность людей (популяцию в целом или отдельную популяционную группу), то к МГК и тестированию добавляются тотальный или селективный скрининг (как элементы массового или

выборочного просеивания). И наконец, в случае применения для лечения конкретного больного современных методов генотерапии, клеточной и тканевой терапии, нанобиотехнологий и наномедицинских технологий к элементам воздействия на субъект добавляются не только специальные методы диагностики (тестирования), но и методы терапевтического и профилактического воздействия. Все эти процедуры должны осуществляться только при наличии информированного добровольного согласия субъекта, вступающего в прямой контакт с врачом или другим специалистом, определяемым и назначаемым врачом в целях глубокого обследования пациента.

В этом плане приоритетно только одно направление: субъект-семья-общество. Противоположное направление невозможно, никакие директивы в данном случае не допустимы.

Неизменным остается правило конфиденциальности: информация врача предназначена только для больного, его опекуна или иного официального представителя, а также для самого врача.

15-16 декабря 1997 г. ВОЗ утвердила общие и частные этические принципы медико-генетической службы. Частные касаются МГК, скрининга, пресимптоматического тестирования, преимплантационной и пренатальной диагностики, тестирования на предрасположенность к МФЗ, принципов работы с банками ДНК. В числе этих принципов:

- справедливое распределение общественных ресурсов для профилактики наследственной патологии на основе необходимости, определяемой тяжестью и важностью проблем и пользой от принимаемых решений;
- уважение генетических и культурных различий, интеллекта человека, а также точки зрения лиц, находящихся в меньшинстве;
- обучение основам генетики всех членов общества, работников здравоохранения, учителей, религиозных деятелей, политиков и др.;
- участие общественности в обсуждении целей медико-генетической службы, используемых ею средств и методов;
- добровольное и информированное согласие субъекта на генетическое и протеомное тестирование, профилактику и лечение заболеваний; исключение всех видов принуждения со стороны государства, общественности или врачей;
- обеспечение субъекта необходимым медицинским наблюдением и лечением; отказ от проведения тестов или процедур не по

медицинским показаниям; постоянный контроль качества этой службы;

- свобода выбора субъекта во всех вопросах, касающихся генетики; женщина должна быть главным лицом при принятии решения в сфере репродуктивного воспроизводства;
- предупреждение дискриминации или стигматизации на основе генетической конституции человека; особое внимание соблюдению прав человека следует уделять при тестировании практически здоровых людей на предрасположенность к МБ и МФЗ с поздним дебютом, эффективных методов профилактики и лечения которых нет; доклиническое тестирование должно проводиться только в интересах ребенка, если очевидна медицинская и психологическая польза от такого тестирования;
- преимплантационная и пренатальная диагностика по медицинским показаниям должна проводиться только для получения семьей или врачом информации о здоровье плода; использование последней для проведения любой социальной политики или в немедицинских целях, например, таких, как тестирование отцовства или селекция по полу, этически неприемлемо (за исключением случаев сцепленных с полом заболеваний);
- преимплантационная и пренатальная диагностика по медицинским показаниям должна быть добровольной и доступной в объеме, зависящем от возможностей каждой страны независимо от взглядов супружеской пары на аборт; только будущие родители могут решить, является ли заболевание плода, выявленное при дородовом обследовании, основанием для прерывания беременности, или информация о болезни плода будет использована ими для подготовки к рождению больного ребенка;
- выбор женщины или супружеской пары относительно сохранения или прерывания беременности больным плодом должен быть принят и защищен.

В 1997 г. состоялась XXIX сессия Генеральной конференции ЮНЕСКО, на которой была принята «Всеобщая декларация о геноме человека и о правах человека», гарантирующая

соблюдение прав и основных свобод человека и учитывающая необходимость обеспечения свободы геномных исследований (как составной части свободы мысли). В декларации сказано: геном человека лежит в основе изначальной общности всех представителей человеческого рода, признания их достоинства и разнообразия, и геном в его есте-

ственном состоянии не должен служить источником извлечения доходов. Никто не может подвергаться дискриминации на основании генетических характеристик; цели и результаты такой дискриминации представляют собой посягательство на основные свободы и человеческое достоинство. Научные исследования генома человека и использование их результатов в биологии, генетике и медицине должны проводиться после тщательной предварительной оценки связанных с ними потенциальных опасностей и преимуществ с учетом всех других предписаний, установленных национальными законодательствами.

В России этические нормы и правила поведения врача и пациента с наследственной патологией регламентируются «Основами законодательства по охране здоровья». Однако в них не учтена семейная распространенность наследственной патологии. Разработаны проекты законов «О генно-инженерной деятельности не на человеке», «О генно-инженерной деятельности на человеке», «О правовых основах биоэтики и гарантиях ее обеспечения». Имеются ведомственные акты, касающиеся этики научных исследований человеческого материала и этики проведения работ с биоматериалом вообще.

Необходимо еще раз подчеркнуть (см. главу 19), что наблюдаемое в молекулярной медицине значительное расширение диагностических и терапевтических возможностей ни в коей мере не умаляет значение основной процедуры врачебного осмотра, в которой главной фигурой был, есть и всегда останется врач.

ЧАСТЬ 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БОЛЕЗНИ С ТРАДИЦИОННЫМ И НЕТРАДИЦИОННЫМ НАСЛЕДОВАНИЕМ. ОТДЕЛЬНЫЕ КЛАССЫ И НОЗОЛОГИИ. ПРОФИЛАКТИКА НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ ГЛАВА 21

МОНОГЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

Общая характеристика

Моногенные болезни (МБ) подчиняются закономерностям менделевского наследования. Они обусловлены точковыми мутациями в единичных генах (см. главу 4).

По данным ВОЗ, среди новорожденных детей МБ встречаются с частотой 30 на 1000 (3%). В отдельных регионах России этот показатель достигает 42-65 больных детей - 4,2-6,5%. В структуре общей смертности детей до 5 лет включительно на долю МБ приходится 12-14%. Известно более 4500 нозологий МБ. Они широко представлены во всех областях медицины. Так, в дерматологии их более 400, неврологии - около 350, оториноларингологии и офтальмологии - по 200-250 нозологий и т.д.

Популяционный риск развития МБ связан с неравномерностью распределения патологических генов этих болезней. Раньше считалось, что МБ, встречающиеся с частотой 1:10 000 человек и более, - это частые болезни; если их частота менее 1:100 000 человек - это редкие болезни; МБ с частотой от 1:10 000 до 1:100 000 - широко распространенные МБ. Последнее определение постепенно вытеснило два первых, ибо в его пользу свидетельствуют данные о том, что, например, в популяциях Средней Азии доля относительно частых аутосомно-рецессивных форм МБ мала по сравнению с таковой

в европейских популяциях, а спектр МБ чрезвычайно широк, хотя и представлен в основном редко встречающимися нозологиями.

В настоящее время список МБ, гены (аллели) или локусы которых картированы на хромосомах, насчитывает 1500 нозологий, тогда как генов самих МБ идентифицировано всего 1100. В этом несоответствии нет противоречий, ибо идентифицированы разные нозологии МБ, связанные с разными точковыми мутациями в одних и тех же генах, и при 400 нозологиях это мутации по типу аллельной серии (см. главу 5). Установлен первичный генный дефект (замена основания, внутригенная делеция и др.) или биохимический дефект (ошибка синтеза или модификации белковой молекулы) почти для 500 генов МБ.

ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ

К настоящему времени разработаны многочисленные классификации МБ. Однако ни одна из них не является исчерпывающей и полностью отражающей специфику этой патологии. Поэтому целесообразно рассмотреть только основные принципы классификаций.

Классификация по типу наследования

Тип наследования МБ связан с локализацией патологического гена в аутосоме или гоносоме и зависит от доминантности или рецессивности гена (см. главу 4). Мужчины и женщины поражаются с одинаковой частотой в случае аутосомного типа наследования и с разной частотой в случае сцепленного с полом или ограниченного полом наследования. На основе этого принципа выделяют:

- аутосомно-доминантные болезни (ахондроплазия, несовершенный остеогенез, нейрофиброматоз Реклингхаузена, ретинобластома, семейная гиперхолестеринемия, синдромы Крузона, Марфана, Холт-Орама, хорея Гентингтона);
- аутосомно-рецессивные болезни (алкаптонурия, альбинизм, атаксия-телеангиэктазия, болезнь Тея-Сакса, врожденная гиперплазия коры надпочечников - АГС), галактоземия, МВ, недостаточность аденозиндезаминазы, пигментная ксеродерма, ФКУ);
- Х-сцепленные доминантные болезни (гипофосфатемия - витамин D-резистентный рахит, орофациодигитальный синдром, синдром недержания пигмента);
- Х-сцепленные рецессивные болезни (гемолитическая анемия, гемофилия АиВ, миодистрофия Дюшенна-Беккера, недостаточность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, синдромы Леша-Найяна, Лоу, Мартина-Белла, Менкеса).

Классификация по органному и системному типу

- Болезни желудочно-кишечного тракта (синдромы мальабсорбции, в том числе врожденный дефицит лактазы, врожденная хлоридная диарея, дефицит энтерокиназы, непереносимость белка коровьего молока и белка сои, первичная гипомagneземия, целиакия).
- Болезни кожи и ее придатков (ангидротическая и гидротическая эктодермальная дисплазия, буллезный эпидермолиз, веретенообразная аплазия волос, врожденная аплазия кожи, вялая кожа, ихтиоз и ихтиозоформные дерматозы, ладонно-подошвенные кератодермии (гиперкератозы), пигментная ксеродерма, синдром Блума, синдром недержания пигмента).

- Болезни нервной системы. Это заболевания нервной ткани, в том числе болезни пирамидной и экстрапирамидной систем, мозжечка, ангиоматозы Гиппеля-Линдау и Штурге-Вебера, атаксия-телеангиэктазия, нейрофиброматоз, туберозный склероз, миотонии (болезнь Томсена и др.), прогрессирующие мышечные дистрофии (например, болезнь Дюшенна-Беккера), спинальные мышечные атрофии (болезни Верднига-Гоффмана и Кугельбергера-Веландер).
- Болезни органов дыхания (альвеолярный микролитиаз, идиопатический диффузный фиброз легких, изолированный легочный гемосидероз, наследственный спонтанный пневмоторакс, первичная легочная гипертензия, синдром Картегенера, трахеобронхомегалия).
- Болезни почек и мочевыводящих путей (синдром Альпорта, болезнь де Тони-Дебре-Фанкони, глюкодиабет, гипофосфатемический рахит, наследственный нефрит, несахарный диабет, поликистозная болезнь - детский и взрослый типы, почечный канальцевый ацидоз).
- Болезни сердечно-сосудистой системы (семейные формы гиперхолестеринемии, гиперлипопротеинемии и гипертриглицеринемии, наследственный амилоидоз, недостаточность карнитина, семейная недостаточность липопротеиновой липазы).
- Болезни соединительной ткани и скелета (ахондроплазия, врожденная косолапость, метатропическая дисплазия, муколипидозы, мукополисахаридозы, несовершенный остеогенез, псевдоахондроплазия, спондилодисплазия и множественная эпифизарная дисплазия, синдромы Марфана, Элерса-Данлоса).
- Болезни эндокринных органов: АГС, врожденный гипотиреоз, гипопитарный нанизм).
- Болезни других органов и систем организма.

Классификация по типу обмена веществ

Благодаря данной классификации многие МБ называются НБО. Среди них выделяют:

- болезни аминокислот (алкаптонурия, альбинизм, гистидинемия, гомоцистинурия, лейциноз, ФКУ);
- болезни биосинтеза кортикостероидов (АГС, гипоальдостеронизм);
- болезни лимфоцитов и лейкоцитов (недостаточность аденозиндезаминазы, септический гранулематоз);
- болезни липидов (ганглиозидозы, гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, муколипидозы, сфинголипидозы, цереброзидозы);
- болезни металлов (болезни Вильсона-Коновалова, Менкеса, семейный периодический паралич);
- болезни порфиринового и билирубинового обмена (синдромы Жильбера, Криглер-Найяра, Порфирии);
- болезни пуринов и пиримидинов (оротовая ацидурия, подагра, синдром Леша-Найяна);
- болезни транспорта систем почек (болезнь де Тони-Дебре-Фанкони, витамин D-резистентный рахит, тубулопатии);

- болезни углеводов (галактоземия, гликогенозы, мукополисахаридозы, непереносимость фруктозы);
- болезни эритрона: анемия Фанкони, гемолитические анемии, недостаточность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Кроме того, в рамках НБО выделяют особую группу болезней накопления, тезауризмозов (см. главу 4). Эта группа МБ объединяет НБО, связанные с дефицитом ферментов лизосом (наследуются с цитоплазмой по материнской линии). Такие НБО проявляются прогрессирующим накоплением предшественников метаболических реакций в клетках разных тканей, например отложением макромолекул гликогена, гликопротеинов, гликолипидов, мукополисахаридов, сфинголипидов, которые в условиях нормального обмена веществ «самоперевариваются» лизосомальными ферментами, что необходимо при очищении организма от продуктов жизнедеятельности и мертвых клеток.

Классификация по этиологии

- Болезни с установленным первичным молекулярным (биохимическим) дефектом. Число таких болезней продолжает неуклонно расти: если по каталогу В. Мак-Кьюсика в 1990 г. насчитывалось около 100 нозологий, то в конце 1993 г. их было уже 328, в 2001 г. - 700, а в 2006 г. - 1500 (33,3%).
- Болезни с неустановленным первичным молекулярным (биохимическим) дефектом. На эти заболевания приходится оставшаяся

часть МБ (66,7%).

В последние годы появилось множество подтверждений ведущей роли первичного молекулярного дефекта. Например, ранее труднообъяснимый факт, что мутации в одном и том же гене (локусе) приводят к разным клиническим проявлениям, теперь объясняется наличием каждый раз разных точковых мутаций в одном гене. Так, врачам-невропатологам давно известны рано начинающаяся тяжелая форма детской миодистрофии Дюшенна и более легкая форма юношеской миодистрофии Беккера, обусловленные дефектами одного и того же гена - дистрофина (см. главу 17). Аналогичный пример касается гена адренорецептора, сцепленного с X-хромосомой: в одном случае конкретная точковая мутация одного гена является причиной болезни Кеннеди, а в другом случае уже другая точковая мутация этого же гена служит причиной синдрома Морриса или тестикулярной феминизации (см. главы 5

и 17).

Другой пример - ген MB, в разных точках которого выделены около 1400 мутаций, приводящих к формированию сходных в целом фенотипов, но с разной тяжестью клинических проявлений.

Вообще составление классификаций МБ на основе выявления обуславливающих их первичных молекулярных (биохимических) дефектов - чрезвычайно трудное дело. Если еще учесть, что при некоторых МБ наблюдается высокий процент вновь возникших мутаций (например, при миодистрофии Дюшенна 30% мутаций *de novo*), то еще больше становится понятной ведущая роль первичного молекулярного дефекта именно на уровне гена. Следствием такого дефекта являются структурные и функциональные нарушения на другом уровне - уровне белка-дистрофина.

Более того, для осуществления простых или сложных биохимических реакций первоначально всегда требуется координированная экспрессия нескольких генов.

Например, в случае ФКУ разными генами кодируются разные субъединицы олигомерного белка-фермента: фенилаланингидроксилазы, дефицит которой обуславливает развитие заболевания. При этом субъединицы олигомерного белка различаются между собой по молекулярной массе и изоэлектрическим точкам. Следовательно, при определении болезни на основе критерия первичного биохимического дефекта в рамках одной моногенной формы будут выявляться фенотипы, не только обусловленные разными мутациями в разных точках одного гена, но и связанные с мутациями в разных генах, т.е. речь идет о генокопировании сходной

клинической картины с разными особенностями течения болезни у разных больных (см. главу 5).

Таким образом, главную роль в возникновении и последующем фенотипическом проявлении первичного биохимического дефекта играет координированная генная экспрессия, которая зависит от вида клеток, периода онтогенеза, влияния геномодификаторов и факторов среды. Подтверждением ведущей роли первичного молекулярного дефекта является также классификация МБ, опубликованная В.С. Барановым и др. (2005).

Классификации МБ на основе мутационных спектров и оптимальных алгоритмов ДНК-диагностики

Классификация базируется на двух принципах: это уникальность спектра мутационных изменений каждого гена (причины уникальности приведены в главе 5) и оптимальные алгоритмы для их ДНКдиагностики.

Авторами классификации предложено разделение МБ на два класса.

Первый класс - это болезни, вызванные немажорными мутациями, равномерно распределенными по всей нуклеотидной последовательности гена. В их число включены замены, делеции, дупликации и инсерции одного или нескольких нуклеотидов. Данный класс МБ представлен: аутосомно-доминантным врожденным поликистозом почек, гемофилией А и В, множественными эндокринными неоплазиями (МЭН), семейным раком грудной железы и раком яичников, семейным аденоматозно-полипозным раком толстого кишечника, CRASH-синдромом (болезнь LI), синдромом Смита-Лемли-Опица, X-сцепленной формой синдрома Альпорта, X-сцепленной гидроцефалией.

Для молекулярной диагностики этого класса МБ применяются методы ДНК-анализа для выявления неизвестных мутаций, но чаще других используется комбинация методов SSCP (анализ одонитевого конформационного полиморфизма) и методов анализа отдельных экзонов с последующим прямым секвенированием тех фрагментов ДНК, где подозревают наличие мутаций (см. главу 19).

Второй класс - это болезни, вызванные мажорными мутациями, которые принципиально важны для ДНК-диагностики. Среди таких патологий: ахондроплазия, болезни Вильсона-Коновалова, Леша-Найяна и Ретта, болезни накопления, МБ, рецессивные формы

наследственной глухоты (несиндромальная несенсорная тугоухость), ФКУ. Для идентификации каждого типа мажорной мутации предложен оптимальный метод из общего арсенала методов ДНК-анализа, включающий мультиплексную ПЦР с анализом внутригенных полиморфных сайтов рестрикции и др. (см. главу 19).

Третий класс - это болезни, вызванные протяженными дупликациями и делециями, возникшими в результате неравного кроссинговера или неправильного спаривания гомологичных хромосом во время мейоза, которое происходит по фланкирующим

повторам участка ДНК, содержащего ген. Такая мутация называется генной конверсией (см. главу 5), и если в участок нуклеотидной последовательности ДНК (область мутации) вовлечен, например, ген RMP22 (17p11.2), контролирующий синтез периферического миелинового белка 22, то возникнет аутосомно-доминантная моторно-сенсорная нейропатия Шарко-Мари-Тус.

Особенно много мутаций в результате генной конверсии возникает в псевдогенах. В этом случае происходит перенос фрагмента одного аллеля в другой аллель гена или перенос фрагмента псевдогена в нормальный ген. Например, такая мутация происходит при переносе последовательности псевдогена в ген 21-гидроксилазы (CYP21B) при

АГС.

К данному классу мутаций принадлежит мутация, обуславливающая развитие болезни Гоше - это самая частая аутосомнодоминантная болезнь накопления. В ее основе лежит мутация гена GBA (1q21), гена глюкоцереброзидазы (лизосомной гидроксилазы), рядом с которым локализован псевдоген psGBA.

В настоящее время выделены 115 точковых мутаций гена GBA. В их числе - дупликации, делеции и конверсии, возникающие в мейозе между геном и псевдогеном.

Типичной патологией этого класса МБ считается сцепленная с полом миодистрофия Дюшенна-Беккера (Xp21), обусловленная мутациями (протяженными делециями и дупликациями, микроделециями и нонсенс-мутациями) самого крупного гена человека, кодирующего белок - дистрофин, входящий в состав сарколеммы мышечного волокна. Кроме того, сюда относятся семейная мышечная атрофия трех типов, включающая болезнь Верднига-Гоффмана, болезнь Кугельбергера-Веландер и промежуточную форму. Все типы мышечной атрофии представляют собой аллельные варианты мутаций одного дуплицированного гена SMN1 (5q13).

Копия этого гена - ген SMN2 - вариант псевдогена, располагается ближе к центромере и отличается от гена SMN1 по 8 нуклеотидам, причем 5 из них находятся в интронах, а 3 - в экзонах (различия в гене и псевдогене выявляются методом SSCP и методом ПДРФ-анализа).

Четвертый класс - это болезни экспансии, в основе которых лежат динамические мутации (см. главу 27).

В последние годы была опубликована еще одна классификация, согласно которой все МБ делят на три группы в соответствии с видом наследственной изменчивости (см. главы 2 и 5):

- болезни, обусловленные мутационной изменчивостью генома; в каталоге В. Мак-Кьюсика (OMIM) перечислено 1100 мутаций идентифицированных, отчетливо проявляющихся в фенотипах больных при 1,5 тыс. МБ (см. выше);
- болезни, обусловленные вариационной (комбинативной) изменчивостью генома, в составе которого выделены не менее 50% повторяющихся последовательностей ДНК, относящихся к 5 классам: повторы, возникшие из транспозонов, неактивные перемещенные копии клеточных генов, простые повторяющиеся последовательности, сегментарные дупликации, блоки tandemноповторяющихся генов. Эти повторы ДНК перестраивают геном, вызывая эктопические нарушения, приводящие к развитию болезней генома;

- болезни, обусловленные эпигенетической (эпигеномной) изменчивостью, связанной не со структурными нарушениями генома, а с изменениями регуляции генной активности, которые, хотя и наследуются, но обратимы. К примерам эпигеномных нарушений относятся: инактивация X-хромосомы, эффект положения теломеры, сайлесинг гена, тканевая специфичность и возрастзависимая модификация ДНК, парамутации, трансфекции, импринтинг, цитодукция и гомологзависимые процессы;
- болезни, обусловленные изменениями в геноме, в том числе гонадный мозаицизм, мейотический драйв, прионизация, цитоплазматическая наследственность, экспансия нуклеотидных повторов.

Завершая рассмотрение всех известных классификаций МБ, следует отметить: в последние три десятилетия выделены новые формы МБ, не вошедшие по разным причинам в указанные классификации, которые поэтому нельзя считать совершенными.

В частности, еще в 70-80-е годы прошлого века появились первые сообщения о митохондриальных и пероксисомных болезнях, которые (совместно с тетауризмозами - см. выше) были сначала отнесены к болезням обмена клеточных органелл, а затем причислены к классу болезней материнского наследования. В свою очередь, в 90-е годы XX в. выделены болезни геномного импринтинга и болезни экспансии числа нуклеотидных повторов, которые, правда, частично вошли в классификацию МБ, учитывающую мутационные спектры и методы ДНК-диагностики. Наконец, совсем недавно был выделен класс прионных болезней (см. главы 3 и 28).

Примеры наиболее распространенных МБ

В странах Запада в родовспомогательных учреждениях (центрах планирования семьи и репродукции) проводится обязательный неонатальный скрининг новорожденных - это либо массовое (тотальное), либо селективное (выборочное) «просеивание» доступного биологического материала, взятого от новорожденных, с целью молекулярногенетической или биохимической диагностики наиболее распространенных МБ, в том числе наследственных болезней обмена веществ. Общее количество «просеиваемых» нозологий в странах «семерки» уже достигло 300 заболеваний (в России - только 5 нозологий). Ниже приводится выборочный, примерный список таких нозологий и указаны их частоты в популяции (в порядке снижения).

- Синдром Мартина-Белл (фрагильная X-хромосома или сцепленная с X-хромосомой УО). Ген заболевания (FMR1) локализован в сегменте Xq27 (хромосомный маркер - fra Xq27). Частота - 0,5: 1000.
- МВ. Ген CFTR локализован в сегменте 7q32 и кодирует белокрегулятор трансмембранной проводимости ионов хлора. Частота в странах Европы и Северной Америки - 1:2 тыс.; в азиатских странах встречается редко.
- Миодистрофия Дюшенна-Беккера (Xp21) - 1:3-3,5 тыс. у мужчин.
- Нейрофиброматоз Реклингаузена, тип 1 (17q11.2) и тип 2 (22q11.2) - 1:3-5 тыс.
- Врожденный гипотиреоз (8q24.3) - 1:4,7 тыс. При незобных формах гипотиреоза гены локализованы в сегментах 1p13 и 14q31.
- Миотоническая дистрофия (миотония Томсена). Ген локализован в сегменте 19q13.6. Частота - 1:10 тыс.; в некоторых популяциях 1:1000.

- ФКУ (12q24.1). При ФКУ, обусловленной дефицитом дегидроптеридинредуктазы, ген локализован в 4p15.1. Частота - 1:10 тыс.
- Гемофилия А (Xq28). При гемофилии В ген локализован в Xq25.3. Частота - 1:10 тыс. у мужчин.
- Опухоль Вилмса (11p14.2) При втором типе опухоли Вилмса ген локализован в 11p15.3. Частота - 1:10 тыс.
- Недостаточность альфа-1-антитрипсина (14q32) - 1:3-20 тыс.
- Хорея Гентингтона (4p16) - 1:12,5-25 тыс. и гораздо выше в популяциях-изолятах.
- Ретинобластома (13q14.2) - 1:14 тыс.
- Несовершенный остеогенез (7q21.3; 17q21.4) - 1:15 тыс.
- Гистидинемия (12q21.4) - 1:23 тыс.
- Атаксия-телеангиэктазия (11q23.1) - 1:30-50 тыс.
- Галактоземия (9p13.1) - 1:35-50 тыс.
- Лейциноз или болезнь с запахом мочи, напоминающим запах кленового сиропа (болезнь кленового сиропа). Это гетерогенная группа, дефектные гены локализованы в локусах 19q13.1, 1p31.2 - тип 2, 6p22.2 - тип 3. Частота - 1:90-120 тыс.
- Аргининиянтарная ацидурия (7q11.2) - 1:300 тыс.
- Болезнь Тея-Сакса (15q22.4) - 1:360 тыс. в большинстве популяций и 1:3,6 тыс. у евреев-ашкенази.
- Тирозинемия, тип I (15q22.5). При тирозинемии II типа ген локализован в локусе 16q23.2. Частота 1:900 тыс.
- ТКИД или недостаточность АДА (20q13.1) - 1:1,5 млн.
- Недостаточность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Xq28) - редкий этнический вариант; в отдельных популяциях частота у мужчин составляет от 1:4 до 1:20.
- Серповидноклеточная анемия (11p15.3) - характерна для популяций американских негров и Экваториальной Африки - 1:400.
- Талассемия альфа (16p13.1) и бета (11p15.3) - встречается в эндемичных по малярии регионах мира.

Показания для лабораторной диагностики наследственных болезней обмена

А. Симптоматика, выявляемая на первом году жизни ребенка.

- Задержка психомоторного и физического развития в сочетании со следующими признаками:
 - прогрессирующее к концу первого года жизни отставание психоневрологических функций, эпилептические припадки в первые месяцы жизни;

- рвота, дегидратация, желтуха, мышечная гипотония или гипертония, нарушение дыхания, судороги, летаргия, кома, асцит;
- необычный цвет и запах мочи и/или запах немытого тела, в том числе «мышинный» запах, запах потных ног, солода, кленового сиропа;
- диарея, гипотрофия (исключить экзогенные причины);
- гепатомегалия и/или спленомегалия неясной этиологии.
- Выявляемые при лабораторном исследовании основных биологических жидкостей больного (кровь, моча) метаболический ацидоз, алкалоз, сахар, белок, ацетон в моче, лейкоцитопения и/или тромбоцитопения, изменение иммунологических показателей.

Б. Симптоматика, выявляемая на втором году и в последующие годы жизни ребенка.

- Прогрессирующее развитие УО и неврологической симптоматики после периода нормального развития разной продолжительности.
- УО в сочетании со следующими признаками:
 - задержка физического развития;
 - гаргоилический дисморфизм, тугоподвижность суставов, искривление позвоночника;
 - гидроцефалия, глухота, помутнение роговицы, катаракта, вывих (подвывих) хрусталика;
 - изменение волос и ногтей;
 - гепато- и/или спленомегалия, поражение почек, экзема;
 - эпилептические припадки, интоксикация, летаргия, кома, рвота, диарея, алалия, дизлексия.
- УО неясной этиологии.
- Гипотрофия неясной этиологии.
- Непереносимость отдельных продуктов питания, проявляющаяся анорексией, диареей, задержкой развития.
- Нефролитиаз.
- Лабораторные данные (те же, что и для первого года жизни).

ХАРАКТЕРИСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ НОЗОЛОГИЙ МОНОГЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Галактоземия

Галактоземия относится к моносахаридозам, НБО простых Сахаров. Впервые описана в 1908 г. А. Рессом. Это аутосомно-рецессивная форма, проявляющаяся с частотой 1:15 тыс. Известны три генетических варианта, связанных с недостаточностью ферментов, превращающих галактозу в глюкозу в клетках печени. На рис. 64 представлена схема развития метаболических блоков при галактоземии.

Как видно на схеме, на первом этапе метаболических превращений образовавшаяся в кишечнике пищевая лактоза фосфорилируется в печени под действием галактокиназы или

галактозо- 1-фосфорилазы (ген локализован в сегменте 17p24). В результате образуется галактозо-1-фосфат, который под действием галактозо-1-

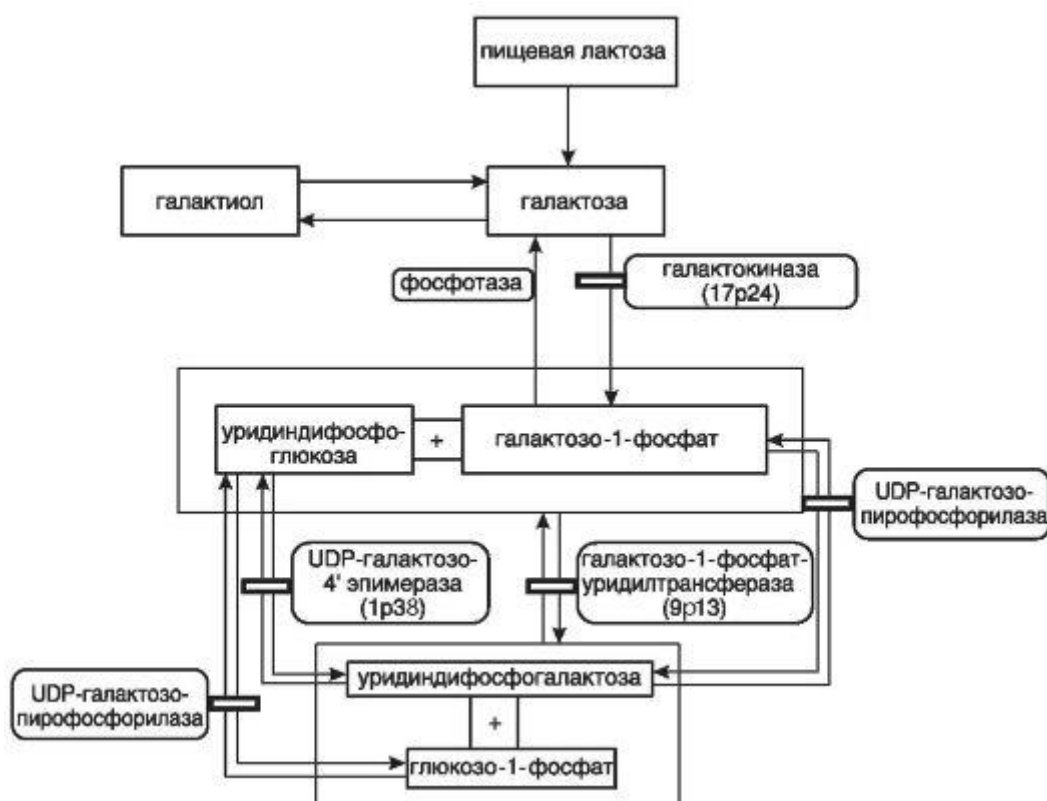


Рис.

64. Схема превращений галактозы и метаболические блоки, приводящие к галактоземии (по Иванову В.И., 2006)

фосфатуридилтрансферазы или фермента Г1ФУТ (9p13) с участием в качестве кофермента NAD^+ превращается в уридиндифосфогалактозу (UDP-галактоза) и глюкозо-1-фосфат. На следующем этапе UDP-галактоза под действием UDP-галактозо-4-эпимеразы (1p38) преобразуется в уридинфосфоглюкозу (UDP-глюкоза) и глюкозо-1-фосфат.

Все эти реакции обратимы, и глюкоза легко превращается в галактозу. Наиболее распространенным считается вариант галактоземии I типа, недостаточности фермента Г1ФУТ (9p13), обусловленной однонуклеотидными заменами (мажорная мутация - Cln188Arg). В основе патогенеза галактоземии лежит токсическое действие накапливающихся в результате метаболического блока галактозы и галактозо-1-фосфата на клетки и ткани мозга, печени, кишечника и почек. В этих тканях и органах ингибируется бактерицидная активность лейкоцитов и развитие септических проявлений. При значительном накоплении галактозы она метаболизируется по побочному пути с образованием спирта - галактиола, вызывающего разрыв зонулярных волокон хрусталика и развитие катаракт.

Манифестация первых признаков заболевания происходит в виде повторной рвоты, диареи и желтухи, развивающихся через несколько дней после первого кормления младенца материнским молоком. При отсутствии лечения в первые недели жизни формируется гепатомегалия и появляются гемолитические изменения.

В дальнейшем наблюдаются: задержка психомоторного развития, внутричерепная гипертензия, гипотрофия, почечная недостаточность и катаракты; возможна смерть от

почечной или церебральной недостаточности. Генокопиями галактоземии служат другие генетические варианты, приводящие к метаболическим блокам.

Диагностика галактоземии проводится на доклинической стадии путем тотального биохимического скрининга новорожденных. Возможна пренатальная диагностика: исследование активности фермента Г1ФУТ в культуре клеток плода и определение присутствия галактизола в амниотической жидкости.

У детей старшего возраста диагноз ставится на основе характерной симптоматики, повышения уровня галактозы и галактозо-1-фосфата в плазме крови и моче, недостаточности Г1ФУТ в эритроцитах, лейкоцитах и фибробластах, а также с помощью ДНК-диагностики (идентификация мутаций в гене Г1ФУТ и других генах (см. выше).

Лечение галактоземии проводится на основе безлактозной диеты. Эффективность лечения снижена из-за перенасыщения глюкозой, образующейся в организме больного.

Гиперфенилаланинемии

ГФА - это гетерогенная группа аутосомно-рецессивных заболеваний, связанных с нарушениями метаболизма ФА - незаменимой аминокислоты, которая не синтезируется в организме, а поступает с пищей.

Под действием ФАГ основное количество поступившего с пищей ФА превращается в тирозин, являющийся субстратом для синтеза аминов и меланина, и лишь небольшое его количество используется для синтеза белка.

На рис. 65 приведена схема превращения ФА в тирозин и последующего превращения тирозина в другие продукты метаболизма с выделением в этих реакциях основных метаболических блоков в случае развития МБ (альбинизм, алкаптонурия, врожденный гипотиреоз и ФКУ).

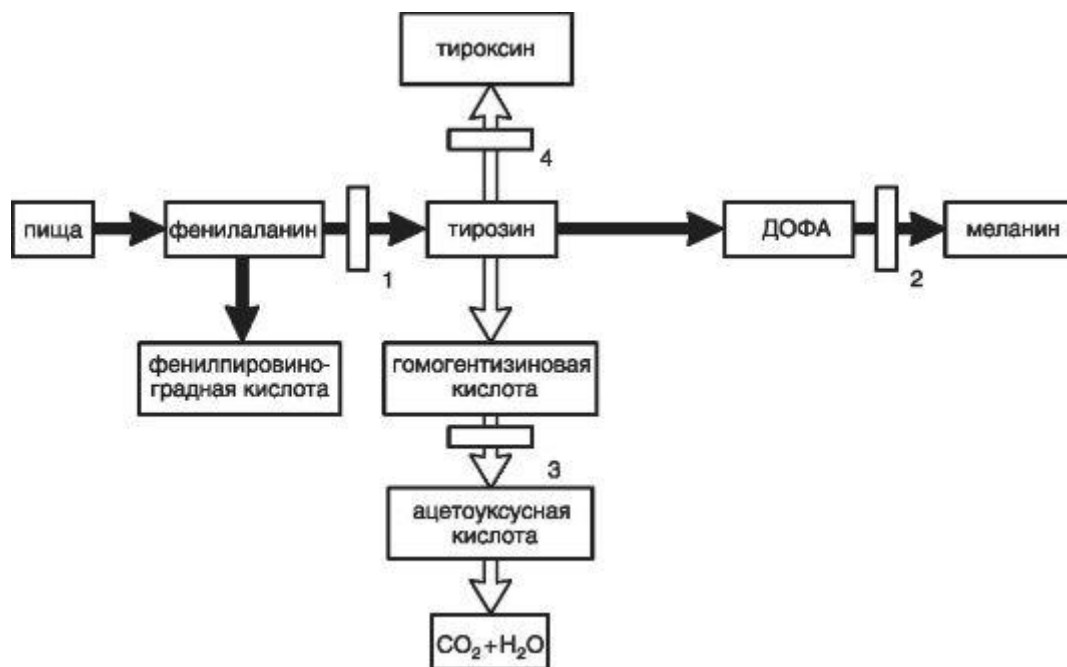


Рис.

65. Схема превращений фенилаланина и тирозина и основные метаболические блоки на их пути (по Иванову В.И., 2006)

Прямоугольниками на стрелках указаны метаболические блоки: 1 - фенилкетонурия; 2 - альбинизм; 3 - алкаптонурия; 4 - врожденный гипотиреоз

ФАГ - это печеночная оксигеназа со смешанной функцией. У плода ФАГ состоит из двух белковых субъединиц: стабильной (в качестве кофактора она имеет птеридин) и лабильной. Во взрослом организме имеются три стабильные субъединицы: ФАГС, тетрагидробиоптерин (ВН₄) и молекулярный кислород. При этом ВН₄ служит восстановителем молекулярного кислорода при встраивании его в ряд субстратов: ФА, тирозин и триптофан.

Кроме того, от ВН₄ зависят тирозиновая и триптофановая гидроксилазы.

На рис. 66 представлена схема ферментативных реакций с участием тетрагидробиоптерина в качестве кофактора, переходящего в дегидроформу или форму дегидробиоптерин-хинона. Образовавшийся тирозин тремя разными путями превращается либо в тироксин (основной путь), либо в ДОФА, либо в гомогентизиновую кислоту.

В случае возникновения мутаций в генах, кодирующих эти метаболические пути, развиваются указанные выше метаболические блоки. Один из таких блоков возникает в ходе основного пути гидроксилирования ФА в тирозин, что ведет к избыточному накоплению ФА и развитию гиперфенилаланинемий.

Известны три причины гиперфенилаланинемий:

- мутации в гене, кодирующем злокачественную (классическую) ФКУ (ген РАН); ген локализован на хромосоме 12 (12q22-q24.2);
- мутации в генах, кодирующих ферменты, контролирующие синтез биоптерина; один из этих генов - ген гуанозинтрифосфатциклогидролазы (GCH I), локализован на хромосоме 14 (14q22.1-q22.2); кроме того, известны три аллельные формы (тяжелая, средней тяжести и транзиторная) гена 6-пирувоилтетрагидробиоптерин-синтетазы (PTS), локализованного на хромосоме 11 (11q22.3-q23.3);
- мутации в генах, кодирующих ферменты, контролирующие дальнейшее превращение ФА: две аллельные формы (тяжелая и средней тяжести) гена дегидроптеридинредуктазы - ген QDPR, локализованный на хромосоме 4 (4p15.3), птеридин-4 альфакарбиноламиндегидратаза - ген PCBD, локализованный на хромосоме 10

(10q22).

Вместе с тем, имеются данные, согласно которым обратные превращения кофакторов ФАГ в нормальную форму не ведут к нарушениям метаболизма ФА (Дадали Е.Л. и Барышникова Н.В., 2006).

В настоящее время разработана общая классификация ГФА (три группы).

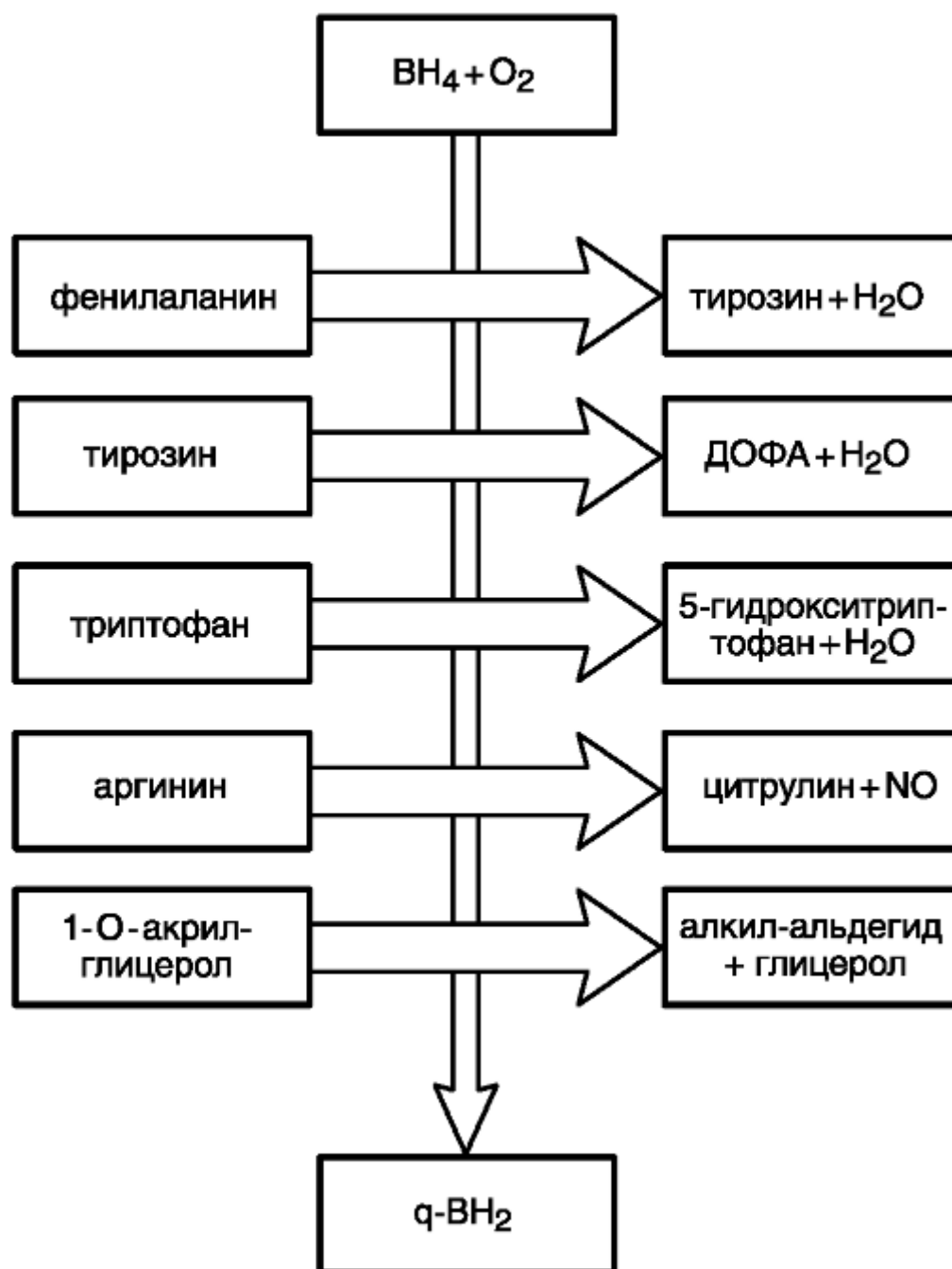


Рис.

66. Схема ферментативных реакций с участием биоптерина в качестве кофактора (по Иванову В.И., 2006)

- ФАГ-зависимые ГФА (95% всех случаев). ФАГ-зависимые ГФА сопровождаются снижением активности ФАГ.
- Выделяют:
 - при резко сниженной активности ФАГ - классическую форму злокачественной ФКУ;
 - при умеренно сниженной активности ФАГ - атипичную форму ФКУ.
- ФАГ-независимые ГФА (5%) сопровождаются нормальной активностью ФАГ.

Выделяют:

- биоптеринзависимые (нарушение синтеза и нарушение метаболизма); они реже встречаются, чем ФКУ, и отличаются от нее отсутствием эффекта от диетотерапии; наиболее распространены две формы: *первая форма* - недостаточность дегидроптеридинредуктазы, которая восстанавливает активную форму тетрагидробиоптерина (мутация в гене, локализованном на хромосоме 4 (4p15.3), частота 1:100 тыс.; при отсутствии лечения дети погибают в раннем возрасте; *вторая форма* более мягкая, обусловлена недостаточностью пирувоилтетрагидроптеринсинтетазы, преобразующей дегидроптеридинтрифосфат в тетрагидробиоптерин; частота - 1:30 тыс.;

- другие ГФА, включая тяжелые клинические формы, не связанные с установленными биохимическими дефектами, формы без клинических проявлений.

- Транзиторные формы ГФА. Эти формы обусловлены незрелостью ферментных систем у новорожденного с глубокой недоношенностью и функциональной несостоятельностью (вследствие незрелости).

Транзиторные формы ГФА вызывают временное увеличение концентрации ФА в сыворотке крови в результате тирозинемии, спровоцированной преждевременными родами и чрезмерным употреблением белковой пищи беременной (такая пища ингибирует собственные ферменты у плода). Такую тирозинемию следует отличать от тирозиноза у франкоязычного населения Канады.

Фенилкетонурия

ФКУ - это классическая форма аутосомно-рецессивной ФАГзависимой ГФА с резко сниженной активностью ФАГ.

ФКУ была впервые описана Феллингом в 1934 г. Теперь известно, что она вызвана мутацией гена РАН, локализованного на хромосоме 12 (12q22-q24.2). Частота в популяции - 1:10 тыс. человек.

Особенности ФКУ:

- высокая частота болезни в европейских странах (Ирландия - 1:4560, Белоруссия - 1:5,6 тыс., Германия - 1:6,7 тыс., Чехия - 1:8 тыс., Россия - 1: 6,35 тыс., г. Москва - 1:11,8 тыс.);
- тяжелый исход болезни (необратимая УО) в случае несвоевременной диагностики (до 6 мес жизни);
- высокая частота гетерозиготного носительства гена болезни - 1:50 человек.

Манифестация ФКУ происходит в первом полугодии жизни: обычно в возрасте 2-6 мес, иногда через 2-3 нед после рождения ребенка. Первые проявления болезни: вялость, отсутствие интереса к окружающему, повышенная возбудимость, беспокойство, частое срыгивание, мышечная гипотония или гипертония, судороги, признаки аллергического дерматита. Появляется специфический «мышинный» запах. Характерны гипопигментация кожи, волос и радужной оболочки глаз. Отчетливо формируется задержка психомоторного развития. При отсутствии лечения развивается необратимая УО.

В основе патогенеза ФКУ лежат аминокислотурия и ацидоз тканей, причинами которых являются следующие метаболические нарушения:

- внутриклеточное накопление (до метаболического блока) ФА и его производных (фенилпировиноградная, фенилмолочная и фенилуксусная кислоты, фенилэтиламин, фенилацетилглутамин);

- высокая концентрация ФА и его производных в крови и моче;
- нарушение реабсорбции и транспорта ФА и тирозина.

В результате этих нарушений наблюдается прямое токсическое действие продуктов метаболизма на ЦНС, нарушаются функции печени, обмен белков, липо- и гликопротеидов, метаболизм гормонов.

Диагностируют ФКУ на основе совокупности генеалогических данных (в том числе о ФКУ у сибсов), результатов клинического и биохимического обследования (превышение уровня ФА в крови более 900-1200 мкмоль/л); наличия положительной проба Феллинга.

Прямая диагностика ФКУ - идентификация наиболее частой мутации R408W (в Китае и Японии не встречается); она проводится с помощью ПЦР и последующей рестрикции.

Методом патогенетического лечения ФКУ является диетотерапия, ограничивающая поступление в организм белка и ФА до уровня минимальной возрастной потребности.

Для коррекции питания назначают белковые гидролизаты, лишенные ФА, но имеющие все другие необходимые аминокислоты (апонти, берлофен, нофелан). Дополнительно назначают витамины группы В, микроэлементы, минеральные вещества. Выбор тактики лечения (особенности диетотерапии) зависит от первичного биохимического дефекта.

Муковисцидоз

МВ (или кистофиброз) - одно из наиболее тяжелых заболеваний детского возраста. Относится к патологии экзокринных желез (бронхиальных, потовых, слезных, слюнных, ушных), а также поджелудочной железы и печени (имеют экзокринную и эндокринную функции).

Болезнь наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Средняя продолжительность жизни больных МВ составляет 25-30 лет. Частота МВ колеблется от 1:2 тыс. (Америка, Англия, Россия, страны Северной Европы) до 1:40 тыс. (Финляндия) и 1:170 тыс. (Африка). В России ежегодно рождаются 700-750 детей с МВ.

Ген болезни локализован в сегменте 7q32.1. Он кодирует белокрегулятор трансмембранной проводимости ионов хлора (cflr - кистофиброзный трансмембранный регулятор), являющийся транспортным белком АТФазы. Чаще всего, развитие болезни связано с мажорной мутацией или делецией кодона в 508 положении гена - del F508 (70-85% всех мутаций этого гена).

Всего выделено около 1400 точковых мутаций гена МВ (предполагается до 5 тыс.).

При этом заболевании речь идет о значительной по объему и спектру полиморфной аллельной серии, представленной разными мутациями в разных точках одного гена.

Нарушения в ионном канале обусловлены вторичными дефектами в клеточном метаболизме. Изменения количества электролитов и белка в секрете экзокринных желез нарушают его физико-химические свойства, вызывая повышенную дегидратацию и вязкость, что сопровождается закупоркой протоков желез и развитием вторичных изменений, особенно выраженных в легких, поджелудочной железе и кишечнике. В результате плохо отделяемый секрет закупоривает мелкие респираторные (бронхиальные) пути и небольшие протоки поджелудочной железы. При этом изменяется среда эпителиальной поверхности, что приводит к росту бактериальных колоний, нейтрофильному воспалению и нагноению слизистой и обуславливает хронический

легочный процесс вследствие недостаточности экзокринной функции поджелудочной железы.

Клиническая картина МВ зависит от типа точковой мутации и характеризуется полисистемным поражением. Наиболее тяжело протекают инфекции дыхательных путей. Быстро развиваются бронхиты, пневмонии, абсцессы и бронхоэктазы. У 27% больных развивается астматический синдром. Процесс осложняется дыхательной недостаточностью и развитием легочного сердца. Возможны пневмоторакс, кровохарканье, кровотечение.

Тяжело протекает поражение желудочно-кишечного тракта. Кишечные симптомы связаны с нарушением активности ферментов поджелудочной железы. Гнилостные процессы в кишечнике приводят к вздутию живота, появлению обильного жирного стула с резко выраженным запахом (родители отмечают появление жирных пятен на белье).

При закупорке меконием (мекониальный илиус) развивается кишечная непроходимость (7-15% случаев). У 15-30% больных выявляется локальный или генерализованный билиарный цирроз печени.

Для больных МВ также характерны: выраженная гипотрофия (несмотря на повышенный аппетит), явления авитаминоза К (гематомы, кровотечения и кровоизлияния), авитаминозы А, Е и D.

Выделяют следующие клинические формы МВ:

- смешанная (70% случаев);
- преимущественно легочная (11%); при ней поражение органов пищеварения минимально или отсутствует;
- абортивная или стертая (11%);
- преимущественно кишечная (5%);
- мекониальная непроходимость (3%).

Это условное деление, так как одна форма практически всегда переходит в другую форму. Диагностические тесты

Потовый тест или стимуляция потовых желез пилокарпином с помощью ионофореза. После стимуляции потоотделения пот собирается на фильтровальную бумагу и проводится его химический анализ с определением концентрации натрия и хлора (положительным считается превышение уровня в 60 ммоль/л у детей и 70 ммоль/л у взрослых).

Бромидный тест или определение концентрации брома в поте и крови после нагрузки бромом (положительным считается повышение уровня брома до 50-100% при норме 20%).

Тест на протеолитическую активность кала или определение уровня ферментов поджелудочной железы в кале (отдельно анализируется содержание нейтрального жира, клетчатки, мышечных волокон и крахмала; проводится рентгенопленочный тест на отсутствие трипсина в кале).

Кроме того, определяется активность ферментов дуоденального содержимого.

Помимо перечисленных диагностических тестов, разработаны программы массового скрининга новорожденных на МВ, включающие два этапа: определение иммунореактивного трипсина в пятнах крови и альбумина в меконии, а также электролитов в поте.

Лечение муковисцидоза в основном симптоматическое. Применяются непрерывная или прерывистая антибиотикотерапия, сочетание аминогликозидов с цефалоспоридами, бронходилататоры, гормонотерапия, витамины, ферменты и диета.

Обязательны ЛФК, вибрационный массаж, постуральный дренаж. Прямой метод лечения - генотерапия с применением векторных систем (аденовирусы и липосомы) - находится в стадии клинических испытаний.

С 1980 г. в Англии, Франции и США осуществляются тысячи успешных трансплантаций легких, а с 1985 г. - сотни трансплантаций легких и сердца. В этих странах активно проводится пренатальная диагностика МВ. Например, в США подсчитано, что своевременная пренатальная диагностика МВ и прерывание беременности ежегодно экономят в одном штате 187,5 тыс. долларов.

В России имеется крайне ограниченное число центров по лечению детей с МВ, а потому МГК охвачены только 10-15% больных.

Болезни накопления К болезням накопления относятся МБ, связанные с нарушениями структуры и функционирования лизосом цитоплазмы, основная функция которых заключается в ферментативном расщеплении и окислении разных макромолекул клетки (см. главу 6).

Наиболее известные лизосомные болезни - это гликогенозы, МЛ, МПС и СФЛ.

Гликогенозы

Гликогенозы - группа НБО полисахаридов, развивающихся в результате нарушений синтеза или распада гликогена на простые сахара. При этом нормальный и аномальный гликоген одновременно накапливаются в цитоплазме клеток печени и других органов, что позволяет рассматривать гликогенозы, с одной стороны, как болезни накопления, а с другой стороны - как болезни материнского наследования (см. главы 4 и 6).

Известны 12 типов гликогенозов, наследуемых в основном по аутосомно-рецессивному типу (кроме IX типа - X-сцепленный рецессивный тип).

Классификация гликогенозов основана на различиях в дефектах ферментов, лежащих в основе заболеваний. Выделяют следующие гликогенозы.

- Гликогеноз I типа или болезнь Гирке (дефект глюкозо-6- фосфатазы ЭР). Это наиболее частая форма (37%). Известны несколько генетических вариантов первый вариант обусловлен мутацией в гене, картированном на хромосоме 17(17q21); второй вариант связан с мутациями в гене Ca^{2+} -связывающего белка, стабилизирующего каталитическую активность глюкозо-6- фосфатазы (локус не картирован); третий вариант связан с мутациями гена T1 (11q23), производящего белок, обеспечивающий микросомный транспорт глюкозо-6-фосфата.
- Гликогеноз II типа или болезнь Помпе. Развивается в результате дефицита лизосомного фермента альфа-D-глюкозидазы (у детей) или недостаточности кислой мальтазы (у взрослых). Такая недостаточность ведет к отложению негидролизованного гликогена в

лизосомах мышцы сердца и скелетных мышц, где появляются «пенистые клетки», создающие ложную картину прогрессирующей мышечной дистрофии. Выделяют три формы болезни: младенческую (может вызвать «смерть в колыбели»), детскую и взрослую. По частоте проявления занимает 10% от всех гликогенозов. Ген локализован в сегменте 17q23.

- Гликогеноз III типа (лимитдекстриноз) или болезнь Форбса- Кори. При этом заболевании снижена или вообще отсутствует активность фермента амило-1,6-глюкозидазы. Ген болезни локализован на хромосоме 1 (1p21). Частота достигает 26% от всех гликогенозов.

- Гликогеноз IV типа (амилопектиноз) или болезнь Андерсен. Наблюдается дефицит амило-1,4,1,6-трансглюкозидазы. Ген картирован на хромосоме 3 (3p12).

- Гликогеноз V типа, или болезнь Мак-Ардля. Наблюдается дефицит мышечной фосфорилазы. Ген локализован на хромосоме

11 (11q13).

- Гликогеноз VI типа или болезнь Герса. Характерен дефицит фосфорилазы печени. Локализация гена предполагается на хромосоме 14.

- Гликогеноз VII типа или болезнь Таруи. Наблюдается снижение активности фосфофруктокиназы. Ген локализован на хромосоме 1 (1q32).

- Гликогенозы типов VIII, IX, X, XI и 0 (нулевой тип) - встречаются редко.

Симптоматика гликогенозов проявляется на первом году жизни гипогликемией и лактат-ацидозом, сопровождающимися рвотой, судорогами, потерей сознания (вплоть до комы). Больные отстают в росте, у них отмечается локальное отложение жировой клетчатки на щеках («кукольное лицо»), груди, ягодицах, бедрах; могут возникать ксантомы на локтях и коленях.

Особенности течения болезни зависят от места депонирования гликогена: печень, почки, мышечная ткань. Соответственно выделяют цирроз печени, почечную форму и мышечную форму (включая сердечную форму).

Появление и нарастание гипогликемии может привести к развитию двух клинических синдромов: «внезапной смерти» или «смерти в колыбели», и «респираторного дистресс-синдрома». При развитии у больных легочной гипертензии и сердечной недостаточности смерть наступает в юношеском возрасте.

Лечение гликогенозов в основном симптоматическое. При отсутствии лечения продолжительность жизни резко снижена и не превышает одного-трех лет.

Муколипидозы

Муколипидозы (МЛ) - это группа заболеваний, отличающихся большим фенотипическим сходством с МПС и связанных с генокопированием одного и того же (сходного) фенотипа, однако при МЛ нет характерного для МПС клинико-биохимического показателя экскреции с мочой ГАГ, т.е. МЛ - это «мукополисахаридозы без мукополисахаридозурии».

В цитоплазме фибробластов кожи таких больных обнаружены множественные вакуоли (лизосомы), наполненные включениями в виде нерасщепленных фрагментов субклеточных мембран и соединений гликозаминопротеогликановой и гликолипидной

природы. Наличие этих включений послужило основанием для выделения МЛ II типа или I-клеточной болезни (I - inclusion или включение), что связано с обнаружением в биоптатах тканей больных «раздутых» клеток, содержащих нерасщепленные продукты метаболизма. Ген I-клеточной болезни локализован в сегменте 4q21-23. Он контроли-

рует присоединение маннозо-6-фосфатной группировки, обеспечивающей транспорт гидролаз, которая «узнается» рецепторами мембран лизосом.

Выделены также МЛ I, III (псевдолиподистрофия Гурлер) и IV типов. Они различаются между собой специфическими ферментативными нарушениями, морфологическими признаками и тяжестью течения болезни. Гены МЛ II и III типов локализованы в сегменте 4q21.4.

Следует отметить, что при I-клеточной болезни и псевдолиподистрофии Гурлер их характерной особенностью служит недостаточность лизосомных гидролаз в фибробластах кожи и лейкоцитах крови (альфа-нейроминидаза, арилсульфатаза А, бета-галактозидаза, гексоаминидаза А и В, сфингомиелиназа). При этом в жидких средах организма наблюдается существенное повышение их активности, которое обуславливает увеличение активности гидролаз в сыворотке крови, что связано с отсутствием в молекулах упомянутой выше маркерной группировки (маннозо-6-фосфата). При всех четырех типах МЛ в фибробластах кожи повышается общее содержание сиаловых кислот, Gm3- и Gd3-ганглиозидов.

Клиническая картина МЛ (особенно I типа) во многом напоминает таковую гаргоилического дисморфизма: грубые черты лица, поражение опорно-двигательного аппарата (но не при IV типе), разные офтальмологические симптомы (особенно при IV типе), УО (но не при III типе), миоклонические судороги, иногда висцеромегалия.

МЛ диагностируется на основе генеалогических данных, фенотипических признаков, электронномикроскопического исследования биоптатов тканей и органов, показателей нормальной почечной экскреции ГАГ, олигосахаридурии, высокой активности лизосомных гидролаз в сыворотке крови, идентификации продуктов накопления и их выделения. Лечение МЛ во многом соответствует лечению

МПС.

Мукополисахаридозы

Одна из первых форм мукополисахаридозов (МПС) была описана Гурлер в 1917 г. С тех пор она называется болезнью Гурлер (см. ниже).

МПС - это гетерогенная группа заболеваний, отнесенных к НБО сложных сахаров и сопровождающихся нарушениями ферментативного катализа ГАГ, их избыточным накоплением в лизосомах

клеток разных тканей и органов, а также повышенной экскрецией с мочой. ГАГ - это кислые мукополисахариды, состоящие из глюкуроновой кислоты, сульфатированного гексоаминина, аминсахароз и нейтральных сахаров, соединенных с белками. Существуют в форме протеогликанов: гепаран-, дерматан-, кератан-, хондроитин-4(6)-сульфатов, которые служат важными компонентами структурного белка-коллагена (белка соединительной ткани) и альфа-кератина (белка волос).

Большинство МПС характеризуется аутосомно-рецессивным типом наследования, кроме болезни Хантера (Х-сцепленный рецессивный тип). Манифестация МПС происходит до 7-летнего возраста (обычно в 2-3 года). Характерны: задержка роста (нанизм), карликовость,

контрактуры суставов, кифосколиоз, массивный череп с глубоким и удлиненным турецким седлом, короткая шея, деформация грудной клетки, веслообразные ребра, укорочение трубчатых костей, грубые черты лица, помутнение роговицы, гепатоспленомегалия, задержка психического развития, кондуктивная глухота, паховые и пахово-мошоночные грыжи, пороки сердца, гликозоаминогликанурия (до 100-200 мг в сутки).

Этот симптомокомплекс получил название гаргоилического дисморфизма или патологического фенотипа, сходного с фенотипом «уродцев», некогда украшавших барельеф собора Парижской Богоматери (до пожара в XVII в.). Именно такой фенотип у звонаря Квазимодо, описанного в романе классика французской литературы Виктора Гюго.

Гетерогенность МПС

Всего выделено не менее 10 генокопий, включая 5, связанных с нарушением активности сульфатаз и гликозидаз (4) и дефицитом трансферазы (1). Среди генокопий следующие:

- МПС I типа или болезнь Гурлер; сопровождается сниженной активностью альфа-L-идуронидазы и накоплением в тканях дерматан- и гепаратансульфатов. Ген локализован на хромосоме 4

(4p16.3).

- МПС типа IS и МПС типа H/S . Оба типа рассматриваются как аллельные формы гена МПС I типа. Протекают более благоприятно.

- МПС II типа или болезнь Хантера (Xq28). Сопровождается снижением активности L-идуросульфатсульфатазы и отложением в тканях дерматан- и гепарансульфатов. Клинические признаки

менее выражены. Продолжительность жизни больше, чем при других типах.

- МПС III типа или болезнь Санфиллипо. В зависимости от первичного биохимического дефекта выделяют 4 варианта: А (дефицит гепарансульфатазы), В (дефицит фермента N-ацетил-альфа-глюкозаминидазы), С (дефицит фермента глюкозамин[^]-ацетилтрансферазы) и D (дефицит фермента [^]ацетил-глюкозамин-6-сульфатсульфатазы). В клинической картине преобладают психические расстройства: агрессивность и деменция. Продолжительность жизни не превышает 20 лет. Ген варианта D локализован в сегменте 12q14; гены других вариантов не картированы.

- МПС IV типа или болезнь Моркио. Выделяют подтип А (дефицит галактозамин-6-сульфатсульфатазы) и подтип В (дефицит бета-галактозидазы). В тканях откладывается кератансульфат. Преобладают поражение скелета и непропорционально низкий рост. Ген подтипа А локализован в сегменте 16q24.3, подтипа В - в сегменте 22q13-qter.

- МПС V типа или болезнь Шейе. Относится к МПС I типа. Ген не картирован.

- МПС VI типа или болезнь Марото-Лами. Дефицит фермента N-ацетил-галактозамин-4-сульфатсульфатазы (арилсульфатазы В). В тканях накапливается дерматансульфат. Фенотипически напоминает МПС I типа, но интеллект не снижен. Ген локализован в сегменте 5q13-q14.

- МПС VII типа или болезнь Слая. Дефицит фермента бетаглюкуронидазы. В тканях накапливаются дерматан-, гепаран- и хондроитинсульфаты. Фенотипически напоминает

МПС I типа, но имеет более доброкачественное течение. Ген локализован в сегменте 7q21.1-q22.

Диагноз МПС ставится на основе совокупных данных генеалогического анализа, клинических проявлений, типичных рентгенологических данных, экскреции с мочой оксипролина (снижение), ГАГ и их фракций (превышение в 5-10 раз).

Однако точная идентификация типов МПС возможна только с помощью определения активности соответствующих ферментов в лимфоцитах и лейкоцитах крови, культуре фибробластов кожи, биоптатах печени, а также моче.

Лечение МПС в основном симптоматическое. Оно заключается в назначении терапии, способствующей нормализации (стабилизации)

процесса в опорно-двигательном аппарате, ССС и ЦНС, паренхиматозных органах, органах зрения и слуха.

Перспективным считается плазмаферез, очищающий организм больного от чрезмерного количества ГАГ.

Сфинголипидозы

Среди болезней накопления выделяют гетерогенную группу СФЛ, обусловленных снижением активности ферментов, обеспечивающих деградацию сложных липидов - сфингомиелинов, к которым относятся галактозиды, цереброзиды и церамиды. Эти соединения являются производными сфингозина - аминоспирта, имеющего 18 углеродных остатков, к которым через аминовые и гидроксильные группы присоединяются другие компоненты (например, гексозы) и сиаловая кислота.

Разнообразие СФЛ определяет особенности распределения отдельных сфинголипидов, входящих в состав клеточных мембран головного мозга и других тканей, а также характер развивающихся метаболических блоков при нарушениях метаболизма. СФЛ наследуются, как правило, по аутосомно-рецессивному типу и проявляются крайне редко (1:360 тыс.), кроме болезни Тея-Сакса, частота которой в популяции евреев-ашкенази достигает 1:3600.

Среди СФЛ выделяют группы, подгруппы, отдельные генетические варианты (типы) и клинические формы, различающиеся по времени манифестации заболевания, выраженности симптоматики и тяжести течения. Клиническую вариабельность связывают с уровнем остаточной активности ферментов, специфичностью субстратов и их распределением в тканях.

СФЛ, сопровождающиеся поражением ЦНС, делятся на две группы:

- болезни с преимущественным нарушением обмена миелина, содержащегося в белом веществе мозга;
- болезни с преимущественным нарушением обмена цереброзидов, содержащихся в сером веществе мозга.

Следует отметить, что неврологическая симптоматика характерна для большинства СФЛ, за исключением некоторых форм: болезни Гоше, Нимана-Пика и Фабри (см. ниже).

Среди основных симптомов СФЛ выделены: двигательные расстройства, поражение опорно-двигательного аппарата (типичное также для МПС), изменения кожи, сетчатки глаз и внутренних органов (почки, печень, селезенка), прогрессирующее слабоумие.

Продолжительность жизни больных резко снижена. Наиболее известными формами СФЛ являются ганглиозидозы или болезни, связанные с генерализованным распадом ганглиозных клеток, развитием глиоза и вторичной демиелинизацией. Общепринято латинское обозначение ганглиозидозов: символ G обозначает ганглиозид; символы m1 (моно), m2 (ди), m3 (три) - количество остатков сиаловой кислоты. Среди них выделены три типа.

- Gm1 - ганглиозидоз или дефицит изоферментов А, В и С бетагалактозидазы с накоплением в тканях ганглиозида m1, асило- Gm1-ганглиозида и кератансульфата. Ген локализован в сегменте 3p21.2. Болезнь известна также под другими названиями: болезнь Тея-Сакса с висцеральной локализацией, псевдогурлер-синдром или нейровисцеральный ганглиозидоз. Выделяют две клинические формы: юношеская (болезнь Дерри) и инфантильная; первая отличается от второй более поздней манифестацией симптоматики.
- Gm2 - ганглиозидоз или мутации генов болезни Сандхоффа (тип II), ювенильного ганглиозидоза (тип III), типов IV-VII (крайне редки). Ген болезни Сандхоффа локализован в сегменте 5q13.2. На этой же хромосоме предполагается локализация гена АВ-варианта этой болезни. Ген ювенильной и взрослой форм ганглиозидоза Gm2 локализован в сегменте 15q22.4 (там же, где ген болезни Тея-Сакса). Иногда к III типу ганглиозидозов относят ювенильную форму болезни Сандхоффа.
- Gm3 - ганглиозидоз или блокада фермента галактозоаминотрансферазы.

Болезнь Тея-Сакса

Болезнь Тея-Сакса - это наиболее известная форма ганглиозидоза, связанная с недостаточностью лизосомного фермента гексоаминидазы А во всех тканях и органах. В них одновременно повышена активность гексоаминидазы В. Ген болезни Тея-Сакса локализован на хромосоме 15 (15q22.4). Вследствие недостаточности гексоаминидазы А в мозге больных накапливается Gm2-ганглиозид (в 100-300 раз выше нормы).

Заболевание проявляется в возрасте 5-6 мес безразличием ребенка к окружающему. Плач становится слабым и протяжным, появляется гиперacusия (вздрагивание от внезапного шума). Постепенно развивается атония мышц, снижается двигательная активность. Позднее в ответ на минимальный раздражитель развиваются судороги с опи-

стотонусом. Для больных характерны макроцефалия и «кукольное» лицо. В 90% случаев на глазном дне в области желтого пятна сетчатки обнаруживается вишнево-красное пятно - это патогномоничный симптом «вишневой косточки».

В терминальной стадии болезни Тея-Сакса наступает полная обездвиженность ребенка, развиваются бульбарные расстройства, глухота, слепота, трофические нарушения, кахексия, явления декорткации и смерть. Болезнь диагностируется на основе совокупности данных генеалогического анамнеза, клинических и лабораторных данных.

Болезнь Нимана-Пика

Аутосомно-рецессивная болезнь Нимана-Пика - это второй по частоте встречаемости СФЛ. Выделены два гена болезни: *первый* локализован в сегменте (11p15.3), он кодирует сфингомиелиназу и идентифицируется при I и II типах болезни. *Второй ген* локализован в сегменте (18q11-12), он кодирует мембраносвязанный стерочувствительный белок-фосфолипазу М и выявляется при III типе болезни.

Редкие сфинголипидозы

К числу редких СФЛ относятся следующие.

- Аутосомно-рецессивный сульфатидный липидоз или болезнь Шольца. Эта болезнь также называется метахроматической лейкодистрофией из-за накопления в белом веществе мозга метахроматических сульфатидов. Болезнь связана с мутациями в двух генах: арилсульфатазы А (22q13.31) и просапозина (10q21-22). Выделяют 3 клинические формы: поздняя инфантильная, ювенильная и взрослая.
- Тригексозилцерамидный липидоз или болезнь Фабри. Заболевание сцеплено с X-хромосомой (Xq21.6) и сопровождается снижением активности лизосомальной альфа-галактозидазы А. В результате происходит отложение гликофинголипидов в стенках мелких сосудов всех органов, эпителии роговицы, клубочках почек, миокарде, нейронах вегетативных ганглиев. Болезнь прогрессирует медленно.
- Глюкозилцереброзидный липидоз или болезнь Гоше. Для заболевания характерно накопление глюкозилцерамида (глюкоцереброзида), связанное со снижением или отсутствием активности бета-глюкозидазы. Ген локализован в сегменте 1q21.2. Выделяют три типа болезни Гоше: взрослая или хроническая (80% всех случаев), инфантильная (15%), ювенильная (5%).
- Церамидный липидоз (липогранулематоз) или болезнь Фарбера. Характеризуется блокадой синтеза лизосомного фермента - церамидазы. В результате во многих тканях и органах (в коже, гортани, клапанах сердца, плевре и вокруг суставов) накапливаются Gm3- ганглиозид и церамид. Характерно неуклонно прогрессирующее течение.
- Нейрональный цероидлипофусциноз или липогранулематоз. Выделяют три клинические формы: инфантильная, ювенильная (болезнь Баттена) и взрослая (болезнь Куфса). Характеризуются накоплением липофусцина в тканях головного мозга и внутренних органов. Локализация генов инфантильной и ювенильной форм связана с хромосомой 1 (1p32). Биохимические дефекты не установлены.
- Лейкодистрофия или болезнь Краббе. Дефектный фермент - бета-галактозидаза. Ген локализован на хромосоме 14 (14q21-31).
- Метахроматическая лейкодистрофия или генерализованный ксантоматоз (болезнь Вольмана). Дефектный фермент - просапозин (дефицит кислой липазы). В тканях накапливаются холестерин и его эфиры, а также триглицериды. Ген локализован на хромосоме 10 (10q21-22). Известен вариант болезни Вольмана - липидоз с накоплением только эфиров холестерина.
- Абеталипопротеинемия. Характеризуется отсутствием транспорта триглицеридов из тонкого кишечника и печени. В результате развивается дефицит ЛПНП в плазме крови. Ген локализован на хромосоме 2 (2p24).
- Болезнь танжьерских островов. Характеризуется дефицитом липопротеидов высокой плотности (см. главу 6). Это семейная форма болезни.

Лечение ганглиозидозов, сфингомиелиноза и других липидозов симптоматическое: оно направлено на улучшение деятельности центральной и периферической нервной системы и паренхиматозных органов.

ГЛАВА 22. МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ И ЗАБОЛЕВАНИЯ ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Наследование нормальных и патологических признаков организма, генетическая изменчивость которых очевидна, нельзя объяснить с помощью только моногенного варианта, но даже при моногенном наследовании невозможно с уверенностью сказать, что

анализируемый ген будет единственной причиной признака или фенотипа, поскольку один и тот же признак (фенотип) может быть обусловлен мутациями в разных генах или генокопированием (см. главы 4, 5 и 21).

К таким труднообъяснимым вариантам наследования генов и признаков относятся не только редкие качественные отклонения от нормы, но и широко распространенные заболевания неинфекционной природы, а также ряд ВПР.

Среди них: необычные рост, масса и пропорции тела, черты и выражение лица, цвет (окраска) кожных покровов, давление крови, неспецифическая УО или ее противоположность - высокоразвитый интеллект (или даже гениальность), относительно большая по сравнению с обычной продолжительность жизни и так называемое практическое здоровье человека.

В середине XX в. было показано, что такие признаки обусловлены суммарным (аддитивным) действием генетических средовых факторов, и по этой причине их стали называть мультифакториальными. Были выделены три группы мультифакториальных признаков.

- Признаки, характеризующиеся постоянными различиями. Сюда относятся экстремальные варианты распределения признаков, т.е. выходящие за пределы границ нормы, характеризующие эти показатели (пределы гауссова распределения). При этом учитываются отклонения от средних значений более чем на две стандартные ошибки (ниже нижней или выше верхней границы нормы). Если большинство различий в количественных признаках (например, рост или масса тела) имеют нормальное распределение (гауссова кривая с одной вершиной или модой), и это

относится к 94% всех различий, то меньшая доля различий (6%) относится к признакам, характеризующимся постоянными количественными отклонениями, выходящими за пределы нижней и верхней границ нормы или находящимся на грани крайних нормальных значений.

- ВПР. Сюда относятся пороки развития, сопровождающиеся грубыми морфофункциональными изменениями: аномалии Пьера-Робена (расщелина нёба, микрогнатия, глоссотомия, лучелоктевой синостоз), атрезия пищевода, болезнь Гиршпрунга, «заячья губа» и «волчья пасть», врожденный пилоростеноз, врожденный вывих бедра, врожденные косолапость и плоскостопие, пороки нервной трубки (spina bifida, анэнцефалия), пороки сердца и магистральных сосудов, пороки развития почек, гипоспадия, эписпадия, неклассифицированные комплексы МВПР, синдром Клиппеля-Фейла (аномалии развития шейных позвонков) и др.

- Хронические широко распространенные заболевания неинфекционной природы или собственно МФЗ. Сюда относятся: артериальная (эссенциальная) гипертензия, БА, ишемическая болезнь сердца, многие формы рака, псориаз, ревматизм, сахарный диабет I типа, шизофрения и маниакально-депрессивный психоз, ЯБЖиДК и др. На их долю приходится 94-96% всей хронической неинфекционной патологии.

Таким образом, в основе любого мультифакториального признака и заболевания лежат несколько причин. При этом индивидуальный вклад каждой причины в проявление болезни может быть незначительным, и только их суммарный вклад ведет к развитию заболевания.

При многих МФЗ патогенетический механизм может быть запущен несколькими способами: либо одной причиной, либо комбинацией из нескольких причин, которые могут быть чисто генетическими (например, один или несколько главных генов или весь

полигенный комплекс), другие - чисто средовыми (например, химические аллергены), третьи - поведенческими (например, пристрастие к определенной пище), четвертые - социальными и/или психологическими (например, влияние родителей, школы, сослуживцев на работе).

Характеризуя генетические причины, необходимо иметь в виду, что значительное число структурных генов человека включают множественные аллели, расположенные в полиморфных генных локусах (их не менее 6 тыс.), ответственных за производство полиморфных

белковых продуктов (см. главу 5). Следовательно, поскольку число белков человеческого организма весьма велико (их 350-400 тыс., а объем их модификаций - 6 млн) должны существовать организмы с разным сочетанием белков, формирующих мультифакториальные признаки и фенотипы. Их развитие обусловлено совместным действием генетических (наследственных) и негенетических (ненаследственных) причин, на основе которых формируется наследственная предрасположенность. Поэтому МФЗ часто называют болезнями с наследственной предрасположенностью (БНП).

Наследственная предрасположенность

Наследственная предрасположенность (подверженность) - это преобладающий генетический компонент, от вклада которого зависит результат суммарного эффекта генетических и средовых факторов, обуславливающих для индивида большую или меньшую вероятность иметь (или не иметь) мультифакториальный признак, заболеть (или не заболеть) МФЗ.

Наследственная подверженность включает в себя индивидуальные и семейные составляющие части на основе неповторимой уникальности индивида (его генетической конституции), с одной стороны, и наличия у него общих генов с близкими и дальними родственниками - с другой (см. главы 4 и 18).

Порог подверженности

При превышении определенных значений предрасположенности - так называемого порога подверженности - запускается механизм развития мультифакториального заболевания.

За порогом подверженности располагаются больные лица (рис. 67). Однако физически это понятие вряд ли существует, это некая условная шкала индивидуальной восприимчивости к заболеванию, внутри которой от действия средовых факторов будет зависеть, заболеет индивид или нет.

С математической точки зрения, распределение подверженности (как гауссова кривая) имеет одну вершину (моду) и обусловлено большим количеством аддитивно (суммарно) действующих генов и факторов среды, где каждый фактор вносит свой вклад.

Из сказанного следует, что индивид с высокой подверженностью (большим генетическим компонентом) (по Фогелю Ф., Мотульски А., 1989) может не заболеть даже при благоприятных

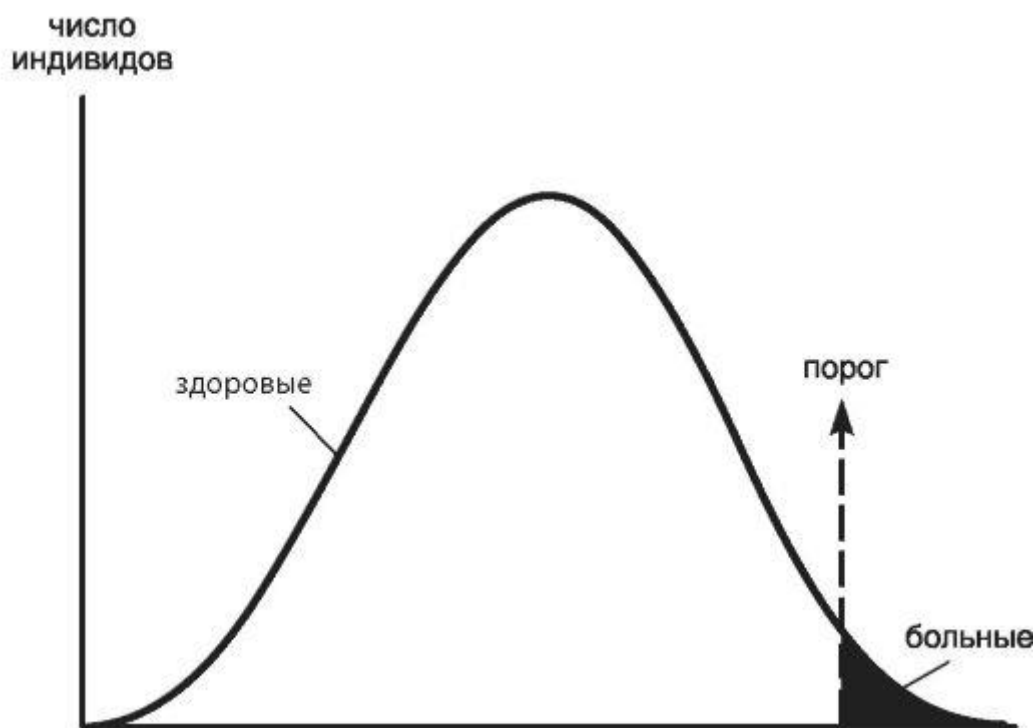


Рис. 67. Распределение подверженности к мультифакториальному признаку и заболеванию (по Фогелю Ф., Мотульски А., 2006).

для проявления болезни условиях среды. Вместе с тем, возможна обратная ситуация.

Таким образом, отличительной особенностью мультифакториального признака и заболевания является то, что один генный локус не может быть ответственным за его развитие - это всегда результат аддитивного (суммарного) действия множества генных локусов и большого числа внешних факторов. Относительная роль каждого генетического фактора и фактора среды различна в каждом конкретном случае.

НАСЛЕДУЕМОСТЬ

Понятие «наследуемость» введено для оценки роли генетических причин и механизмов, т.е. вклада генетических факторов в этиологию и патогенез болезни. Наследуемость - это степень, с которой предрасположенность определяется генетическими факторами в сравнении с факторами среды. Вместе с тем, оценка наследуемости может быть состоятельна лишь при условии, когда

предрасположенность определяется большим числом наследуемых генов.

Для расчетов наследуемости болезни предложен коэффициент, значение которого определяется по формуле $h^2 = Vg/Vp$, где h^2 или K_n - это коэффициент наследуемости, Vg и Vp - соответственно генетическая и фенотипическая компоненты дисперсии. Этот коэффициент выражается в абсолютных числах (от 0 до 1) или процентах и наглядно отражает аддитивный вклад в фенотип только генетических факторов. Низкое значение коэффициента наследуемости подразумевает малый вклад в признак аддитивно действующих генов, высокое значение - большой вклад.

Итак, наследуемость - это популяционно-статистический параметр. Наследуемость большинства БНП превышает 60% (см. главу 4). Теперь рассмотрим основные модели наследования БНП.

Основные модели наследования

Моделей наследования мультифакториальных признаков и фенотипов много. Рассмотрим основные из них.

Во-первых, это *простая (аддитивная) модель*. Она предполагает совместное действие нескольких генов, определяющих подверженность. Модель упрощена и абстрактна, ибо вклад каждого из генов, действующих в мультифакториальной системе, различается в количественном и качественном отношении, и какие-то гены оказываются более важными по значению.

Во-вторых, это *модель наследуемости количественных признаков*. Она предполагает наличие некой переменной величины, которая отражает предрасположение. С одной стороны, эта величина зависит от влияния сходно действующих генов всего генного (полигенного) компонента, а с другой стороны, - от влияния факторов среды.

Каждый из генов и факторов среды влияет на признак, но заболевание возникает лишь в том случае, когда предрасположение достигнет порогового уровня, т.е. речь идет о модели *полигенного компонента с пороговым эффектом*. В случае предрасположенности к заболеванию кривая распределения болезни в семье больного будет сдвинута в область более высокого предрасположения, и поэтому среди родственников будет больше больных, ибо у них имеется некоторое количество общих генов, определяющих предрасположение к болезни.

И хотя эта модель не позволяет конкретизировать роль факторов среды, она удовлетворительно объясняет распространение в семьях

таких заболеваний, как рак, сахарный диабет, врожденные аномалии развития нервной системы, семейная гиперхолестеринемия и др.

В-третьих, имеется *смешанная модель*; ее авторы (Мортон Н. и Мак-Лин К., 1974 г.) анализируют зависимость предрасположения от действия главного гена и/или полигенного комплекса и факторов среды. В этом случае считается, что главный ген и/или полигенный комплекс наследуются по моногенному варианту. При этом лица с генотипом «аа» будут здоровы; у лиц с генотипом «АА» вероятность заболеть будет больше, чем у лиц с генотипом «Аа», и болезнь возникнет в результате влияния генов полигенного комплекса и факторов внешней среды. Причем передача от родителей к детям главного гена и полигенного комплекса происходит с учетом двух условий: влияния факторов среды, общих для родителей и детей, и влияния части признаков (обусловленных полигенным комплексом), различающихся у родителей и детей.

В-четвертых, это *более сложные модели*, согласно которым возникновение признака (фенотипа) зависит от главного локуса, полигенного комплекса и факторов среды. При этом факторы среды могут быть как случайными, так и общими для родственников одной семейной родословной, например пристрастие к сладкой, соленой или острой пище, что является фактором риска развития соответственно сахарного диабета, гипертонической болезни или болезней желудочнокишечного тракта.

Следует подчеркнуть важность учета семейных негенетических факторов, ибо нередко только одним их действием можно объяснить семейный характер наследования некоторых МФЗ.

В-пятых, это *концептуальная модель предрасположенности*, предложенная Ф. Фогелем и А. Мотульски (1989). В ней подчеркивается важность предрасположенности за счет главных генов и генов всего полигенного комплекса, определяющих основной вклад в

развитие болезни (рис. 68). При этом главные гены не действуют в «вакууме», они экспрессируются на фоне всей совокупности генов, модифицирующих их работу. Вместе с тем, предположение об участии главного гена в формировании наследственной предрасположенности к заболеванию может быть высказано только в случае обнаружения в этом гене мутаций, не встречающихся у здоровых людей.

В большинстве случаев патологический белковый продукт, производимый одним или даже несколькими главными генами, играет ключевую роль в развитии симптомов болезни. Например, установлен



Рис.

68. Концептуальная модель предрасположенности к МФЗ (по Фогелю Ф. и Мотульски А., 1989)

значительный вклад главных генов (DRCA1 и DRCA2) в предрасположенность к семейным формам рака грудной железы, а в последние годы показано участие в предрасположенности к этому заболеванию еще и третьего главного гена - DRCA3.

Кроме того, с помощью модели Ф. Фогеля и А. Мотульски в разных группах больных с БНП удалось выделить редкие формы заболеваний, характеризующиеся сочетанным мультифакториальным и моногенным вариантами наследования.

- В группе гиперлипидемий, обуславливающих ишемическую болезнь сердца (ИБС), были выделены две такие формы - семейная гиперхолестеринемия (ген LDRL локализован на хромосоме 19p13.2-p13.1) и семейный дефект Аро-В-100 (ген аро-В локализован на хромосоме 2p23-p24).

- В группе ЭГ были выделены:

- гипертензия, купируемая небольшими дозами глюкокортикоидов (причина - неравный кроссинговер между генами альдостерон-синтазы и 11-бета-гидроксилазы; оба гена локализованы в сегменте 8q21, являющемся областью гена цитохрома

P₄₅₀);

- синдром Лиддла или псевдоальдостеронизм (причина - два гена эпителиального натриевого канала SCNN2 и SCNN3; оба локализованы в сегментах 16p13-p12);

- - синдром Гордона или псевдоальдостеронизм второго типа, а также синдром избытка минералокортикоидов (ген почечной 11-бета-гидроксистероид-дегидрогеназы, локализован в 16p13-p12). В группе сахарного диабета I типа были выделены ряд MODY-форм, обусловленных мутациями единичных генов, в том числе 6 форм, связанных с мутациями в структурных и регуляторных генах: HNF4A (форма 1), GCK - ген глюкокиназы (2), ядерного фактора гепатоцитов (3), фактора-1 промотора инсулина (4), почечного фактора транскрипции 2 (5), NEURODY (6). Следует отметить, что роль генетических факторов оказалась весьма значительной при таких БНП, как ЯБЖиДК, ВПР (дефекты невральнoй трубки, расщелины верхней губы и нёба, врожденная косолапость). При этом семейное наследование отличалось от классического моногенного варианта. В развитии этих БНП и ВПР участвовали неспецифические гены, действующие совместно с факторами окружающей среды. И хотя действие всех факторов было аддитивным, первичный молекулярный эффект неспецифических генов не был определен (рассматривается как «черный ящик»).

При ВПР была дополнительно показана роль случайных факторов, которые нельзя отнести ни к генетическим, ни средовым, ибо они действовали стохастически.

Таким образом, несмотря на наличие множества моделей наследования мультифакториальных признаков и фенотипов и основанного на них сегрегационного анализа, рассмотренная проблема пока не решена.

Ассоциации и сцепление БНП с полиморфными маркерами

Поиск генетических причин предрасположенности к МФЗ подразумевает определение ассоциации болезни с полиморфными маркерами (генами и антигенами) и сцепления болезни с ДНК-маркерами (см. главу 19).

Ассоциация - это более высокая частота определенного полиморфного гена-маркера при конкретном заболевании. Например, имеют место ассоциации антигенов системы HLA с рядом МФЗ, среди которых анкилозирующий и псориатический спондилит и синдром Рейтера (сцеплены с антигеном B27), болезнь Адисона и сахарный диабет I типа (DR3), гемохроматоз (A3), гнездная алопеция (DQW7), псориаз (CW6), ревматоидный артрит и сахарный диабет I типа (антиген DR4), рассеянный склероз (DRB1).

В конце XX в. была описана ассоциация полиморфизма альфа-1-антитрипсина с хронической эмфиземой легких у взрослых, патогенез которой был связан с множественными аллелями локуса P1 (всего 23 разных фенотипа), обуславливающими механизмы разрушения легочной ткани при хронической эмфиземе легких в результате инфицирования.

При этом было показано, что ассоциация не подразумевает, что ген болезни и маркерный ген расположены в одной хромосоме. Например, с HLA-локусами, расположенными на хромосоме 6, могут быть сцеплены гены разных моногенных заболеваний, находящиеся на измеримом расстоянии от HLA-комплекса (АГС, гемохроматоз, спиноцеребеллярная атаксия).

Вместе с тем, сегодня нет оснований считать, что БНП и HLA-комплекс как-то связаны между собой физиологически. Например, к таким заболеваниям относятся аутоиммунные или иммуноассоциированные болезни: болезнь Аддисона, детская спру, миастения гравис, множественный склероз, ревматоидный артрит, сахарный диабет I типа, тиреотоксикоз, хронический гепатит.

Семейный анализ выявил сегрегацию случаев этих заболеваний среди родственников больных пробандов, хотя моногенное наследование отсутствовало.

Следовательно, будучи ассоциированными, D/DR-гены HLA- комплекса и гены аутоиммунных заболеваний не являются сцепленными между собой, т.е. ассоциацию и сцепление следует строго разграничить.

Сцепление относится к двум генам, расположенным в одной хромосоме на определенном расстоянии друг от друга. Для анализа сцепления БНП с полиморфными маркерами в настоящее время используется от 300 до 500 ДНК-маркеров, распределенных по всему геному. На их применении основан метод полного геномного скрининга.

ОТДЕЛЬНЫЕ НОЗОЛОГИИ БОЛЕЗНЕЙ С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ

В последние годы БНП приобрели большое значение в МКГ пациентов, имеющих такие заболевания. В целом на долю подобных пациентов приходится не менее 10% от общего контингента больных, а доля самих БНП (как наиболее распространенной наследственной патологии во взрослой жизни) достигает 60% в общей структуре заболеваемости населения.

Артериальная гипертензия

Артериальная гипертензия (АГ) и выделяемая за рубежом ее разновидность - эссенциальная гипертензия (ЭГ) имеют сходную клиническую симптоматику. И для первой, и для второй характерны семейное накопление, солезависимость и низкий уровень ренина.

В рамках ЭГ выделены три синдрома: синдром Лиддла или псевдоальдостеронизм с АГ (16p13-p12), синдром АМЕ или ложной минералокортикоидной избыточности (16q22), и семейный гиперальдостеронизм, поддающийся лечению небольшими дозами глюкокортикоидов

(8q21).

Установлено: аллельные формы генов этих синдромов одновременно служат генетическими маркерами предрасположенности как к ЭГ, так и к АГ, что является подтверждением правильности объединения этих форм гипертензии на основе клинического сходства.

Итак, АГ - это гетерогенная группа болезней со следующими основными клиническими проявлениями: повышением уровня артериального давления и связанными с ним осложнениями (инфаркты, инсульты, почечная недостаточность).

В настоящее время выделены свыше 100 генов-кандидатов АГ, продукты которых прямо или косвенно участвуют в механизмах ее развития. К числу генов-кандидатов АГ относятся гены:

- SCNN IB и SCNN IG или соответственно 1-бета и 1-гамма - субъединицы эпителиального Na⁺-канала; оба гена локализованы на хромосоме 16 (16p13-p12);
- APNH или ген Na⁺ / H⁺-антипорта (локализован там же);
- REN или ген ренина (1p36.1-p35);
- AGT или ген ангиотензина I (1q42-q43);
- AGE или ген ангиотензина I, конвертирующего фермент (17q22-

q24);

- PLA2 или ген панкреатической фосфолипазы A2 (12q23-q24.1);
- SAH или ген гипертензии, обусловленной геном, экспрессирующимся в почке (16p13.11);
- NOS3 или ген эндотелиальной синтазы окиси азота (7q35-q36);
- F13B или ген фактора свертывания крови XIII;
- PON или ген параоксаназы.

Следует отметить, что в последние годы особый интерес был связан с геном NOS: выделены три изоформы (индуцибельная, невральная и эндотелиальная), определяющие уровень окиси азота в стенках кровеносных сосудов. Этот уровень регулируется с помощью кальмодулинзависимого механизма.

Показано, что именно ген NOS3 отвечает за предрасположенность к развитию ИБС (см. ниже) и способствует тяге к курению.

К продуктам экспрессии указанных генов относятся:

- компоненты ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем;
- компоненты, поддерживающие сосудистый тонус: компоненты кальциевых каналов, синтазы закиси азота;
- компоненты структуры сосудов: коллагенсвязывающий белок, фибриллин, эластин;
- продукты метаболизма стероидных гормонов: 11-бета-гидроксилазы, 17-альфа-гидроксилазы;
- продукты водно-солевого гомеостаза: аквапорины, ионные каналы, рецепторы вазопрессинов;
- рецепторы адренергической системы, например дофаминовые рецепторы.

Следует, однако, отметить, что при изучении полиморфизма генов, контролирующих производство перечисленных выше компонентов, их продуктов и рецепторов, не выявлено значимых ассоциаций с тремя специфическими синдромами, характеризующими ЭГ.

Вместе с тем было показано, что ряд генов, формирующих предрасположенность к АГ, вносят существенный вклад в этиологию другого широко распространенного заболевания с наследственной предрасположенностью - атеросклероза.

Опытные врачи-клиницисты давно отметили, что атеросклероз «ходит» за АГ как тень за человеком, и нередко обе эти формы сочетаются у одного и того же больного индивида, страдающего ожирением и сахарным диабетом (см. ниже).

Атеросклероз и связанные с ним синтропические конгломераты болезней

В конце XX в. заболеваемость атеросклерозом среди взрослого населения разных стран мира стали называть «эпидемией века». Была разработана концепция атерогенеза, объясняющая, что в осно-

ве механизмов развития атеросклероза лежит накопление липидов и липопротеинов низкой плотности в сосудистой стенке.

В настоящее время большое значение приобрела диагностика предрасположенности к атеросклерозу с учетом следующих молекулярногенетических критериев.

Во-первых, повышенный уровень липидов в плазме крови, нарушение процессов свертывания крови и целостности сосудистой стенки.

Во-вторых, общность генов, обуславливающих развитие двух сходных по симптоматике заболеваний: АГ (см. выше) и атеросклероза, что объясняется нарушениями функционирования ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем. В качестве основных генов-кандидатов атеросклероза рассматриваются гены, продукты которых обеспечивают липидный обмен.

В-третьих, достоверно значимое сцепление атеросклероза с локусом СЕРТ на хромосоме 16 или генным локусом, контролирующим транспортный белок эфиров холестерина, а также с кластером генов аро-А1/ароС3/ароА4 на хромосоме 11.

В-четвертых, атерогенная совокупность липопротеинов (APL), которая рассматривается как отдельно наследуемый признак, объединяющий три параметра:

- преобладание частиц липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) или LDL (подкласс В);
- высокий уровень липопротеинов, содержащих повышенное количество триглицеридов (ЛПНОП);
- сниженный уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Выявление у больных атеросклерозом сразу всех трех параметров

нарушения липидного обмена увеличивает риск развития инфаркта миокарда в три раза.

В-пятых, тесное сцепление между APL и локусом рецептора LDL

(Р-ЛПНП).

Выдвинута гипотеза, что ген, отвечающий за предрасположенность к атеросклерозу, отождествляется с геном Р-ЛПНП. Показано, что потенциальный ген развития атеросклероза располагается дистальнее D19S7: в районе гена (19p13.2-p13.12).

Сцепление атеросклероза с локусом Р-ЛПНП подтверждено с помощью метода сибсов в 1996 г. у больных сибсов и пар родственников в семьях, имеющих коронарный атеросклероз.

В-шестых, доказательство принадлежности к генам-кандидатам атеросклероза гена недостаточности гепаринового фактора II (HCF2),

который локализован на хромосоме 22 (22q11) и совместно с другими факторами определяет антикоагуляционное действие гепарина.

В-седьмых, доказательство важной роли ангиотензин-І-конвертирующего фермента (AGE) в регуляции артериального давления и электролитного баланса крови. Этот фермент активизирует ангиотензин І в ангиотензин ІІ и инактивирует брадикинин, а также является сильным вазопрессором и регулятором синтеза альдостеронстимулирующего белка.

Ген AGE I локализован на хромосоме 17 (17q22-q24) и также относится к генам-кандидатам атеросклероза.

Завершая рассмотрение столь важных для диагностики предрасположенности к атеросклерозу молекулярно-генетических критериев, следует отметить, что все они являются общими критериями диагностики многих МФЗ.

Как отмечают В.П. Пузырев и соавт. (2005), такая общность - совсем не случайный факт, а тенденция к полипатии, множественности болезней у одних и тех же пациентов. Около 40% терапевтических больных в возрасте 15-75 лет имеют одновременно две соседствующие болезни, а у каждого пятого терапевтического больного одновременно проявляются четыре болезни - это синтропический конгломерат.

Такие сочетания могут быть чисто случайными, но могут быть результатом общности этиологии и патогенеза, составляя отдельные семейства болезней, изучение которых, безусловно, отвечает целям и задачам протеомики.

Одним из таких синтропических конгломератов болезней является сочетание АГ, атеросклероза, стеноза коронарных сосудов сердца и сахарного диабета II типа - это конгломерат *NIDDM*.

Генами-кандидатами предрасположенности и факторами ассоциации с двумя последними заболеваниями этого конгломерата являются: ACE, аллель D при *NIDDM*, а также связь с уровнем липидов, артериальным давлением, гипертрофией левого желудочка сердца (ГЛЖС) по ЭКГ-критериям и DD-генотипом ACE.

Связь ГЛЖС с DD-генотипом ACE сильнее выражена у мужчин, чем у женщин, и более четко проявляется у лиц с нормальным артериальным давлением (Schunkert H. et al., 1994). В частности, указанными авторами был сделан вывод, что DD-генотип является генетическим маркером повышенного риска развития гипертрофии ГЛЖС у мужчин среднего возраста.

Бронхолегочные болезни

Количество генов, контролирующих развитие и функционирование бронхолегочной системы человека, достигает 2000. Связанные с этими генами бронхолегочные болезни выявляются у 60% пациентов пульмонологических стационаров. На долю моногенных болезней бронхов и легких приходится от 5 до 35% контингента больных с неспецифическими болезнями легких. Их суммарная частота составляет 4:1000.

Как отмечено выше, МФЗ часто сочетаются с МБ. Не является исключением и бронхолегочная патология, которая сочетается с синдромами Марфана, Рандю-Ослера, Эллерса-Данлоса, МВ, МПС и др.

Вместе с тем, гетерозиготные носители генов этих МБ являются, как правило, практически здоровыми людьми, но при воздействии на них и их потомство неблагоприятных экологических и социальных факторов у них наблюдается повышенный риск развития бронхолегочной патологии. Одной из частых причин развития такой патологии служит недостаточность альфа-1-антитрипсина, которая может проявиться как самостоятельное моногенное заболевание или стать ведущим клиническим симптомом при таких МФЗ, как БА, хроническая эмфизема легких и хронические бронхиты.

Недостаточность альфа-1-антитрипсина

Недостаточность альфа-1-антитрипсина в сыворотке крови больных выявляется как в случае выделения ее в отдельную моногенную патологию, так и при ее определении в

качестве ведущего симптома при МФЗ. Она проявляется не только хроническими неспецифическими болезнями и эмфиземой легких, но и поражением печени и сосудов.

Ген болезни (ген Pi) картирован на хромосоме 14 (14q32). Выделены 75 аллельных вариантов этого гена, наиболее частым из которых является аллель PiZ или замена глутаминовой кислоты (кодон GAG) на лизин (кодон AAG). Этот аллель обычно встречается у европеоидов и почти не встречается у негров и монголоидов.

На рис. 69 показана зависимость риска бронхолегочной патологии от наличия разных аллельных вариантов и концентрации альфа-1-антитрипсина в сыворотке крови больных.

Факторами риска развития бронхолегочной патологии являются: курение (основной фактор), пассивное курение, гиперактивность дыхательных путей, нарушающая легочную функцию (например, у больных БА), частые ОРЗ (особенно в детстве), про-

фессиональные вредности (кадмиевая и угольная пыль, неспецифические поллютанты), загрязнение окружающей среды, старческий возраст.

Развитию такой патологии чаще подвержены мужчины, чем женщины. Актуальной проблемой пульмонологии в развитых странах стала проблема организации эффективного селективного скрининга взрослых людей, страдающих эмфиземой легких, и селективного скрининга детей, часто болеющих ОРЗ, включая ОРВИ, на определение недостаточности альфа-1-антитрипсина. Серьезным аргументом в пользу такого скрининга, в ходе которого выявляются мутации гена Pi, стала возможность заместительной терапии препаратами, стимулирующими у больных синтез и секрецию альфа-1-антитрипсина гепатоцитами (демазол и тамоксифен).

Кроме того, для лечения такой патологии широко применяется трансплантация легких.

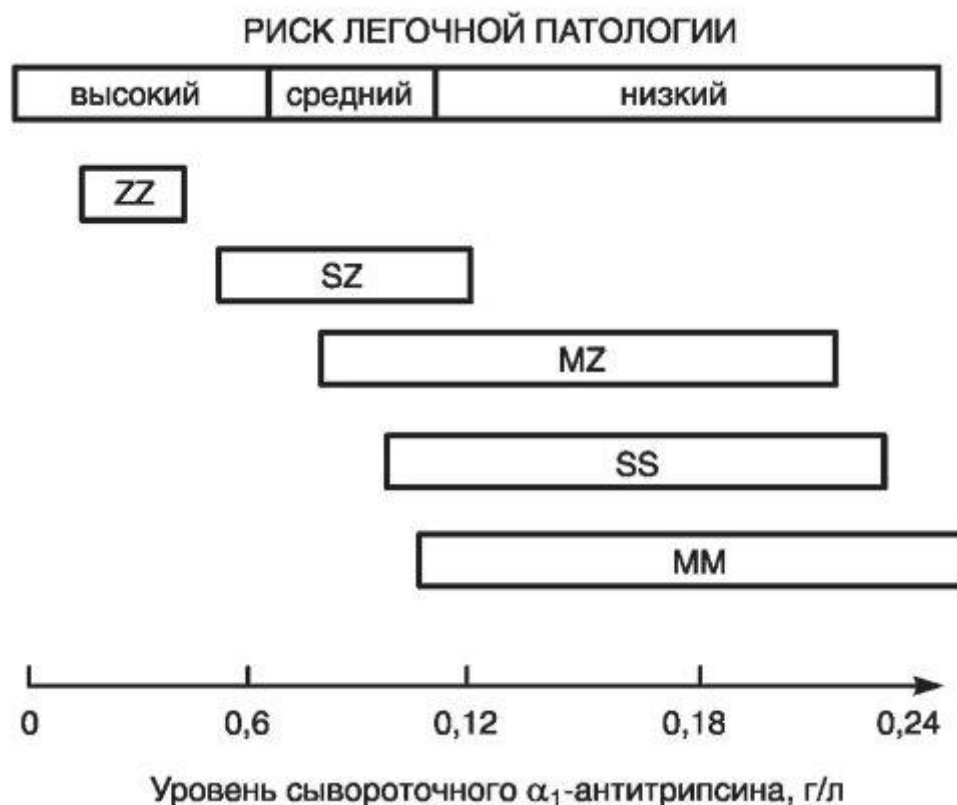


Рис. 69. Риск легочной патологии при разных аллельных вариантах и концентрациях α_1 -антитрипсина в сыворотке крови (по Баранову В.С. и соавт., 2005)

Бронхиальная астма

БА - это хроническое воспалительное заболевание верхних дыхательных путей с периодическими приступами удушья. В большинстве случаев БА является атопическим заболеванием с участием аллергенов внешней среды (см. главу 15) и сопровождается IgE-зависимым иммунным ответом, т.е. это *экзогенная форма БА*.

Патогенетический механизм БА связан со сложным взаимодействием дендритных клеток (см. главу 20), находящихся в слизистой бронхов, с иммунокомпетентными клетками, медиаторами, развитием отека бронхиальной стенки, гиперсекрецией слизи и деструктивными изменениями в бронхах. Результатом этих реакций является повторная экспрессия доминирующего эпитопа внешнего аллергена, вступившего в комплекс с молекулами антигенов HLA II типа на поверхности дендритных клеток. Образовавшийся комплекс связывается с рецепторами CD4 Т-клеток, что стимулирует дифференцировку Т1г0-лимфоцитов в Т1г2-лимфоциты, которые приобретают способность к секреции цитокинов; функционирование связано с гуморальным иммунным ответом и образованием ряда интерлейки-

нов (ИЛ 3-ИЛ5, ИЛ-9, ИЛ13).

В случае действия антигенов микобактерий и некоторых вирусов D4 Т-клетки превращаются в ТЫ-лимфоциты, секретирующие ИЛ-2, гамма-интерферон и ФНО, что вызывает активацию макрофагов и последующую илиминацию микроорганизмов.

Эндогенной или криптогенной формой БА является форма, этиология которой либо неизвестна, либо не связана с аллергическим механизмом высвобождения медиаторов воспаления.

Кроме того, выделена *аспириновая форма БА* вследствие дефекта метаболизма соединений арахидоновой кислоты. В ответ на прием аспирина происходит выброс медиаторов воспаления без участия иммунных реакций, связанных с образованием антител

(Суздальцева Т.В., 1999).

Точное число генов-кандидатов предрасположенности к БА не определено, но, по некоторым оценкам, оно уже достигло 1900. Среди наиболее важных генов-кандидатов БА выделены несколько групп, в том числе:

- 32 гена для идентификации антигенов и факторов гуморального иммунного ответа, включая гены цитокинов (интерлейкины, интерфероны, ФНО и др.), гены рецепторов Т- и В- клеток, а также гены HLA;
- 32 гена рецепторов цитокинов и факторов гуморального иммунитета, белковые продукты которых фиксируют на клеткахмишенях молекулы внешних лигандов;
- 26 генов медиаторов воспаления и сопутствующих им факторов, гены ферментов метаболизма этих соединений, а также гены хемокинов и молекул межклеточной адгезии;
- гены внутриклеточных сигнальных молекул или гены нескольких семейств белков, обеспечивающих и контролирующих трансдукцию сигналов молекул лигандов на «чувствительные» генные локусы; по-видимому, к данной группе относятся еще 11 генов транскрипционных факторов, которые активируются при участии этих посредников;

- другие гены, имеющие функциональные отношения со всеми перечисленными группами генов БА, например гены биотрансформации ксенобиотиков (NAT2, CYP1A, GSTT1 и GSTM1).

В настоящее время проведены исследования генов-кандидатов предрасположенности к БА, выполненные на основе методов позиционного клонирования. Основные результаты: а) среди идентифицированных локусов большое значение имеют локусы: 5q31.1-33, 6p12-21.2, 11q12-13, 12q14-24.1, 13q12.22, 14q11-12, 16p12.12-11.2; б) подтверждено сцепление БА с локусами 5q23-33, 6p23-21, 11q13, 12q15-24.1, 13q12-22; в) дополнительно определено 15 участков хромосом, сцепленных с БА; г) получено подтверждение молекулярных различий между основной формой БА (*per se*) и атопической формой БА (BHR) по сцеплению с уровнем IgE и наличию специфической сенсибилизации при кожном тестировании; д) показана достоверная зависимость количества генов-кандидатов БА, эффектов генов-модификаторов и факторов окружающей среды от межпопуляционной вариабельности частоты заболеваемости астмой или этнического фона.

Завершая краткий анализ основных форм бронхолегочной патологии, следует заключить, что БА относится к одной из наиболее трудных проблем молекулярной медицины. Это обусловлено широкой генетической и клинической гетерогенностью БА, невыясненным характером наследования генов предрасположенности, отсутствием четких критериев диагностики БА и другими причинами. По-видимому, выход из создавшегося положения необходимо искать в определении вклада неблагоприятных сочетаний генетических причин в этиологию и патогенез БА или вклада неблагоприятных

«ансамблей» из сотен и тысяч генов («генных сетей») и средовых факторов.

Безусловно, ускорению таких исследований будет способствовать тщательный анализ общности патогенетических механизмов БА и недостаточности альфа-1-антитрипсина, а также организация эффективной диагностики этих двух сочетающихся заболеваний (синдромического конгломерата) на основе организации селективного скрининга взрослых, страдающих эмфиземой легких, и детей, часто болеющих ОРЗ и ОРВИ, на недостаточность альфа-1-антитрипсина, а также на наличие мутаций генов-кандидатов предрасположенности

к БА.

Сахарный диабет I типа

Сахарный диабет I типа (СД I типа), или инсулинзависимый СД, относят к тяжелым МФЗ. Клиника СД хорошо изучена. Еще со студенческих лет известна симптоматическая аббревиатура СД I типа - это 3 «п» (полифагия, полидипсия и полиурия) и 2 «г» (гипергликемия и гликозурия).

Мультифакториальная модель наследования СД I типа предполагает, что манифестация болезни определяется суммарным действием генетических и средовых факторов. В случае генетических факторов речь идет о вкладе ряда аллелей полиморфных генов, вовлеченных в развитие заболевания, которые получили название генетических маркеров СД I типа. В случае средовых факторов речь идет о дополнительном вкладе неблагоприятных факторов среды. Это подтверждается близнецовыми исследованиями, свидетельствующими, что заболеваемость СД I типа у монозиготных близнецов составляет 40-50% в разных популяционных группах.

Более того, генетическая предрасположенность к СД I типа связана с наследованием группы аллелей «здоровых» генов, которые сцеплены с заболеванием и поэтому

называются «этиологическими мутациями» или вариантами мутаций (в отличие от истинных мутаций).

Считается, что только наличие определенных комбинаций аллельных вариантов в генах предрасположенности может привести к развитию СД I типа. Однако сочетание аллельных вариантов с характером и спектром действия факторов среды пока мало изучено.

Современным подходом в изучении предрасположенности к СД I типа является также анализ ассоциации этого заболевания с полиморфными ДНК-маркерами.

Геном-кандидатом СД I типа называется ген, продукт экспрессии которого (фермент, гормон, рецептор, структурный или транспортный белок) может прямо или косвенно участвовать в развитии этой болезни. Известен ряд следующих полиморфных ДНК-маркеров.

- Однонуклеотидные полиморфизмы в экзонах. Им иногда соответствуют аминокислотные полиморфизмы, а также однонуклеотидные полиморфизмы в интронах, промоторных или регуляторных областях и в 5'- и 3'-нетранслируемых областях генов.
- Последовательности ДНК, содержащие вставки или делеции одного или нескольких нуклеотидов.
- Полиморфные миниили микросателлиты, представляющие собой tandemные повторы с изменяющимся числом повторяющихся единиц. Такого рода повторы могут располагаться как внутри гена (например, в интроне), так и рядом с геном в ближайших к нему районах. Вместе с тем, в большинстве случаев полиморфные ДНК-маркеры не являются этиологическими вариантами, которые определяют предрасположенность к СД I типа, но они достаточно часто могут быть сцеплены с этими вариантами.

В случае исследования СД I типа с применением подхода «генкандидат» в геноме удалось идентифицировать только два локуса, связанных с предрасположенностью к этому заболеванию: locus MHC (главный комплекс гистосовместимости), расположенный на хромосоме 6 (6p21.3), и полиморфный tandemный повтор (VNTR) в 5'-нетранслируемой области гена инсулина (INS), локализованный на хромосоме 11 (11p15.5). Эти два локуса получили специфическое обозначение: соответственно IDDM1 и IDDM2, и именно они определяют 42% случаев семейного наследования СД I типа.

При исследовании СД I типа с применением другого подхода, основанного на анализе полиморфных маркеров в ядерных семьях с двумя больными sibсами (семьи с конкордантными sibсами), а также дополнительного подхода с использованием полных семей с дискордантными sibсами удалось подтвердить сцепление с этим заболеванием 5'-нетранслируемой области гена инсулина.

Кроме того, были изучены предрасполагающие к СД I типа высокополиморфные микросателлитные маркеры, равномерно расположенные на всех хромосомах. Так, было идентифицировано 23 локуса, сцепленных с СД I типа. Анализ полученных данных позволяет заключить, что СД I типа ассоциирован с:

- аллелями гена HLA DQA1, которые кодируют аргинин в положении 52 (Arg 52+);
- аллелями HLA DQB1, которые не кодируют аспарагиновую кислоту в положении 57 (Asp57).

Обе группы этих аллелей обозначаются как аллели, предрасполагающие к развитию СД I типа или аллели S.

В противоположность этим аллелям были выделены аллели, кодирующие Arg 52⁻ и Asp 57⁺, которые обозначаются как аллели, предохраняющие от развития СД I типа, или аллели Р.

Вместе с тем, наиболее высокие оценки риска развития СД I типа могут быть получены при рассмотрении не самих аллелей, а их комбинаций, получаемых из сочетания всех четырех аллелей двух хромосом. Например, риск при сочетании SS/SS составил 52% против 4% в контрольной группе.

В табл. 12 приведено распределение комбинаций предрасполагающих (S) и предохраняющих (Р) аллелей генов HLA DQB1 в группах больных СД I типа и здоровых лиц на примере московской популяции.

Таблица 12. Распределение комбинаций предрасполагающих (S) и предохраняющих (Р) аллелей генов HLA-DQA1 и DQB1 в группах больных СД I типа и здоровых лиц в московской популяции (по Носикову В.В., 2005 г.)

DQA1	DQB1	«диабетогенных» гетеродимеров	Больные СД I типа (n=113)	Здоровые лица (n=11)	OR	P
SS	SS	4	0,52	0,04	23,12	<0,001
SP	SS	2	0,23	0,08	3,1	<0,005
SS	SP	2	0,16	0,12	—	<0,05
SP	SP	1	0,07	0,20	0,32	<0,01
PP	SP	0	0,01	0,07	0,16	<0,05
SS	PP	0	0,01	0,08	0,14	<0,025
PP	SP	0	0	0,17	0,02	<0,001
SP	PP	0	0	0,16	0,02	<0,001
PP	PP	0	0	0,08	0,04	<0,001

Как видно из данных этой таблицы, среди больных резко снижена частота комбинаций из двух предрасполагающих и двух предохраняющих аллелей. Совсем нет лиц с одним предрасполагающим и

тремя предохраняющими аллелями. Нет лиц с четырьмя предохраняющими аллелями, в то же время в контрольной группе частота таких комбинаций 56%. Следует отметить, что кроме генов HLA DQ, в предрасположенность к СД I вовлечены и другие гены HLA, наиболее важными из которых считаются два полиморфных гена DRB1 и DPB1, относящихся к классу II.

Таким образом, основная часть генов предрасположенности к СД I определяется локусом IDDM1 и аллельными вариантами генов: HLA-DRB1, DQA1, DQB1 и DPB1. Предрасположенность к СД I связана с локусами многих других хромосом (всего 20 локусов IDDM). Эти локусы определены на 8 хромосомах: 2 (2q31-q33; 2q33 и 2q31-q34); 3 (3q21-q25); 10 (10p11; 10q11 и 10q25); 11 (11p15.5; 11q13 и 11q22.2-23.3); 12 (12p12-pter); 14 (14q12-q21; 14q24.3-q31 и 14q32.3); 15(15q26), а также X-хромосома, где предполагается 4 сцепленных с этим заболеванием маркера, в том числе у одного маркера выделена область сцепления, соответствующая локусам

Xp11.4-p21.1.

Также обнаружено сцепление 5 маркеров СД I с геном глюкокиназы (GCK), а на экспериментальных моделях животных (крысы и мыши) показана роль гена индуцируемой NO-синтазы (NOS2), которая разрушает бета-клетки островков Лангерганса. Кроме того, в последние годы обнаружен ряд дополнительных локусов, сцепленных с СД I, которые пока не получили обозначения в номенклатуре IDDM и поэтому не имеют номеров. Описаны также маркерные локусы хромосом 1(1q41-q43 - 6 маркеров; 1p41-p34 и 1q12-q24); 5 (5p15 и 5q34-gter) и 16 (16q22-q24).

Завершая рассмотрение данных об этиологии и механизмах патогенеза СД I, необходимо отметить, что сегодня нельзя однозначно признать наличие сцепления с этим заболеванием многочисленных генов-кандидатов предрасположенности к нему. Вместе с тем, при применении метода «ген-кандидат» удалось надежно идентифицировать два локуса: IDDM1 и IDDM2 (VNTR). Главный из них - это первый локус, определяющий 32% случаев семейной ассоциации с ним СД I типа. Причем район его максимального сцепления (MLS=45) находится на расстоянии 85 тыс. н.п. от гена

HLA-DQB1.

Второй локус определяет только 5-15% случаев семейной ассоциации с СД I типа. Обнаружена большая гетерогенность этого локуса в популяции, по-видимому, связанная в одних случаях с материн-

ским типом импринтинга, а в других случаях - с отцовским типом импринтинга (см. главу 4). Вклад других генов второго локуса хотя и значителен, но он меньше вклада генов первого локуса.

Кроме того, аллели локуса VNTR гена инсулина отнесены к «доминантно-предохраняющим» аллелям, а аллели первого локуса - к «рецессивно-предрасполагающим» аллелям. По-видимому, можно считать окончательно доказанным сцепление СД I типа еще с семью локусами (кроме двух вышеперечисленных). В их числе локусы: IDDV4-IDDM6, IDDM10, IDDM12, IDDM13 и маркер DXS1068, расположенный на X-хромосоме; итого - 9 локусов, в которых расположены предрасположенности к СД I.

Язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки

ЯБЖиДК - это системное МФЗ с полигенным вариантом наследования (см. главу 4). Прежде чем рассмотреть причины и механизмы ЯБЖиДК, необходимо отметить, что устойчивость слизистых оболочек желудка и двенадцатиперстной кишки к действию повреждающих факторов обеспечивается активностью тесно связанных между собой клеточных, тканевых и органных ферментных защитных систем, действие которых направлено на:

- достаточную (по количеству и содержанию) продукцию слизи в желудке; снижение общей продукции слизи и изменение содержания отдельных ее компонентов (например, мукополисахаридов, гликопротеинов, сиаловых кислот) ведет к потере способности слизи обволакивать слизистую оболочку;
- активную секрецию бикарбонатов; снижение секреции бикарбонатов нарушает процесс нейтрализации соляной кислоты в гастродуоденальной зоне;
- активную регенерацию покровных эпителиальных клеток в гастродуоденальной зоне; угнетение этой регенерации снижает прочность барьера слизистой желудка, что связано с дефицитом коллагенов I и III типов, необходимых для формирования рубца;

- оптимальное кровоснабжение слизистых оболочек; нарушения регионального кровотока и микроциркуляции в гастродуоденальной зоне сочетаются с нарушениями свертывающей и противосвертывающей системы крови, проницаемостью сосудов и обменом биогенных аминов, что ведет к очаговой ишемии либо в малой кривизне желудка, либо в луковице двенадцатиперстной кишки, которые бедны сосудами;
- сохранение барьерной функции апикальной мембраны клеток поверхностного эпителия - эпителиоцитов, состоящей из трехслойного липопротеинового комплекса; разрушение этой мембраны лежит в основе патогенеза длительно не рубцующихся язв;
- угнетение желудочной кислотной продукции; показано, что аполипопротеин А-IV и трефоил-пептиды снижают кислотную продукцию и ускоряют восстановление поврежденной гастроинтестинальной слизистой оболочки; также показано, что интерлейкин-1-бета и трансформирующий альфа-фактор роста гепатоцитов влияют на белки цитоскелета эпителиоцитов и способствуют их миграции к язвенному дефекту;
- снижение уровня ПОЛ клеточных мембран эпителиоцитов слизистой оболочки; интенсификация уровня ПОЛ ведет к снижению концентрации фосфолипидов в мембранах эпителиоцитов слизистой оболочки, деструкции клеточных структур, нарушению их физиологической и репаративной регенерации.

Кроме того, показано значение иммунных механизмов в развитии язвенной болезни, наиболее выраженных при медиогастральной локализации труднорубцующихся язв. В этом случае нарушается неспецифическая защита, снижается гуморальный иммунитет, изменяется содержание цитокинов, уменьшается количество Т-лимфоцитов и соотношение Т-хелперов и Т-супрессоров.

Также эффективно изучается роль нарушений защитной системы глутатиона при ЯБЖиДК. Установлено, что основным этиологическим фактором в 75-95% случаев язвенной болезни двенадцатиперстной кишки (ЯБДК) и 65-80% случаев язвенной болезни желудка (ЯБЖ) служит *Helicobacter pylori* (НР). Этот условно-патогенный микроорганизм сосуществует с человеком, но при нарушении равновесия в микроэкологической системе желудка и двенадцатиперстной кишки начинает проявлять свое отрицательное воздействие. В России данной бактерией инфицировано 73-91% взрослого и 44-50% детского населения.

Окончательно доказан семейный характер пилорического хелиобактериоза. Например, в Ирландии семейный характер отмечен при инфицировании одного из родителей больного ребенка в 94% заболеваний и при инфицировании сразу двух родителей в 61,5%.

Механизмом патогенетического действия НР является цепь последовательных событий, начинающихся с адгезии НР к желудочному эпителию посредством AEL-феномена: повреждение НР конкретной

области слизистой оболочки - повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} - фосфорилирование и перестройка белков цитоскелета эпителиоцитов и эритроцитов. В пользу этого механизма свидетельствует следующее.

- Ассоциация ЯБЖ с первой группой крови; в частности, у лиц с этой группой крови на слизистой оболочке желудка были экспрессированы адгезивные рецепторы к НР в достоверно большей степени, чем у лиц с другими группами крови.
- НР-опосредованный улцерогенез (образование язвы) или формирование цитотоксических и нецитотоксических реакций замедленного типа, ведущих к иммуноцитолиту участка гастродуоденальной зоны слизистой оболочки. При этом

формирование цитотоксической реакции связано с тремя последовательными событиями. *Первое событие* - продукция вакуолизирующего цитотоксина *vacA*, уменьшающая скорость реэпителизации язв, пролиферацию эпителия и полимеризацию актина в эпителиоцитах, что нарушает целостность их цитоскелета. *Второе событие* - продукция цитоксинассоциированного белка *cagA*. *Третье событие* - продукция уреазы, служащей индуктором апоптоза эпителиоцитов.

- НР-стимулированное ПОЛ, поддерживающее активный воспалительный процесс в пилородуоденальной зоне.
- Дополнительное воздействие других эндогенных и экзогенных факторов, участвующих в патогенезе заболевания и определяющих патогенность НР.

Вместе с тем, теория развития ЯБЖиДК на основе НР не объясняет множества особенностей патогенеза данного заболевания. Не выяснены механизмы образования одиночных язвенных дефектов слизистой оболочки, сезонности смены обострений и ремиссий, а также причины половых различий в проявлении заболевания (редкость поражения лиц женского пола и высокая частота поражения лиц мужского пола). Поэтому НР-инфицированию отводится роль важного, но только пускового локального фактора.

Вместе с тем, главное внимание уделяется наследованию предрасположенности к ЯБЖиДК. В пользу этого свидетельствуют многочисленные данные (Хорошая И.В., 2006). В частности, показано, что наследование предрасположенности к ЯБЖиДК выявляется у 40-50% больных и реализуется независимо от наследственных фак-

торов, предрасполагающих к колонизации НР гастродуоденальной зоны. При этом частота конкордантности монозиготных близнецов по манифестации ЯБЖиДК в 2-5 раз выше, чем дизиготных близнецов. У больных с наследственной отягощенностью, подтвержденной наличием генетических маркеров, заболевание протекало менее благоприятно (тяжелее, с манифестацией в раннем возрасте и в сочетании с пилоростенозом, кровотечениями и перфорациями слизистой); выявлялась генетическая общность между ЯБЖ и хроническим гастритом.

Кроме того, показаны ассоциативные связи между язвенной болезнью и:

- менделирующими признаками (первая группа крови для ЯБДК, вторая группа крови для язвенной болезни кардиальной части желудка); в первом случае риск развития заболевания был на 35% выше, а количество клеток, секретирующих пепсиноген, было на 15% выше, чем во втором случае;
- снижением активности ацетилхолинэстеразы, щелочной фосфатазы (отсутствие кишечного компонента при желудочной локализации и снижение индекса В) и холинэстеразы (отсутствие фракции 3-1 и связь с С₅-компонентом локуса E₂);
- способностью ощущать горький вкус фенилтиокарбомида;
- астеническим телосложением и дактилоскопическим рисунком. Показана гетерогенность болезни по скорости Na⁺-Li⁺-

противотранспорта.

Среди факторов, предрасполагающих к развитию болезни и повышающих ее риск в 1,5-3 раза, отмечено снижение активности альфа-1-антитрипсина и альфа-2-макроглобулина.

Для русской популяции определены иммуногенетические маркеры предрасположенности к дуоденальной язве (HLA-B15) и ее осложненному течению (HLA-A1, HLA-A2).

Показано, что HLA-фенотипы В35, А2/А3, А2/А0 являются прогностически значимыми для оценки риска кровотечения из дуоденальной язвы, а антигены HLA В8 и А3 могут служить прогностическими критериями, свидетельствующими, что болезнь, вероятно, не разовьется. В случае ульцерогенеза предрасположенность может проявиться увеличением массы обкладочных клеток, гиперплазией гастриновых клеток, секреторной гиперактивностью желудка. В последнем случае гиперактивность рассматривается в роли субклинического маркера семейного накопления случаев ЯБДК. В таких

семьях повышение уровня пепсиногена обнаруживается как у больных пробандов, так и их родителей. Также показана связь между аллельным полиморфизмом локуса гена пепсиногена С и язвой тела желудка, а гиперпепсиногемия и гипергастринемия участвуют в патогенезе ювенильных дуоденальных язв.

Таким образом, в исследованиях по этиологии и механизмам патогенеза ЯБЖ и ДК накоплено много фактов, свидетельствующих о значительном вкладе условно-патогенного микроорганизма *Helicobacter pylori* - основного пускового локального фактора, проявляющего свое действие на фоне экспрессии генов предрасположенности к этому заболеванию.

ГЛАВА 23 ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ И МАЛЫЕ АНОМАЛИИ РАЗВИТИЯ

Исторические сведения

В клинической генетике в качестве самостоятельного научного направления выделена тератология (дисморфология), изучающая этиологию, патогенез, клинические проявления, методы диагностики, лечения и профилактики врожденных больших и малых аномалий развития.

ВПР известны из глубокой древности. Об этом свидетельствуют сделанные много тысячелетий назад наскальные рисунки сросшихся близнецов (Австралия), изображение больного с ахондроплазией (Египет), факт врожденной косолапости у египетских фараонов и другие примеры. Одной из первых публикаций, посвященных описанию ВПР, является книга, изданная в 1616 г. в г. Падуге. Интенсивное развитие тератологии происходило в XIX в. В первую очередь это относится к работам И. Меккеля, который описал морфологию и создал первую анатомическую классификацию ВПР. В дальнейшем были опубликованы работы отца и сына Э.Ж. Сент-Илера и И.Э. Сент-Илера, которые применили экспериментальный метод для изучения причин ВПР (воздействие механических факторов на куриные яйца).

В России начало тератологии было положено Указом Петра I от 13 февраля 1718 г. о создании музея уродливостей в Петербурге (в Кунсткамере), где с музейными экспонатами работали эмбриологи К.Ф. Вольф и К.М. Бэр. Первой русской работой по тератологии было «Обозрение разнообразных человеческих уродств» (Загорский П.А., 1811). В 1847 г. вышла первая монография П. Дубовицкого «Взгляд на уродливости вообще», где были даны тератологические понятия и классификации, рассмотрены этиология и механизмы патогенеза пороков.

Однако интенсивное развитие отечественной тератологии началось в начале XX в. после вторичного открытия в 1900 г. законов наследственности. В числе наиболее известных работ на данную тему следует отметить работы И.В. Давыдовского, А.П. Дыбана, П.Г. Светлова, С.Д. Шахова и других морфологов.

Качественно новый этап развития российской тератологии был связан с работами Е.Ф. Давиденковой, Г.И. Лазюка, А.А. Прокофьевой-Бельговской, В.П. Эфроимсона, одними из первых применивших в исследованиях пороков развития методы медицинской генетики.

И наконец, современный этап развития тератологии, начавшийся в середине 80-х годов прошлого столетия, связан с расшифровкой причин и механизмов врожденных болезней как формы наследственной патологии человека.

Общая характеристика

Врачи любой специальности постоянно встречаются с ВПР у детей и взрослых. В ряде случаев эта патология легко обнаруживается уже при первом осмотре новорожденного (анэнцефалия, микроцефалия, гидроцефалия, расщелины верхней губы и нёба, укорочение конечностей, черепно-мозговые и спинно-мозговые грыжи и др.). В других случаях ВПР выявляются только при применении синдромологического подхода и клинико-инструментальных методов обследования (пороки сердца, почек, органов дыхания, пищеварения и др.).

Как правило, врожденная патология оказывает существенное влияние на состояние здоровья человека. Вместе с тем, известны врожденные дефекты, которые не оказывают такого влияния. По данным ВОЗ, популяционная частота врожденных пороков и аномалий развития среди населения составляет 1,5-5% (в отдельных странах - от 2,7 до 16,3%); средняя частота - 3%, или 30 случаев ВПР на 1000 рождений. В постнатальном периоде число детей с пороками достигает 6% к двухлетнему и 8% к пятилетнему возрасту. В структуре общей смертности детей на долю ВПР приходится до 15-20%, а перинатальной смертности - от 4-7,7 до 26-29% (по данным прозектуры).

Врожденная патология чрезвычайно разнообразна, количество пороков и аномалий развития исчисляется сотнями. Они выявляются во всех системах организма: как единичные БАР и МАР, так и целые комплексы множественных пороков развития. Среди них на первом месте по частоте встречаемости находятся изолированные пороки развития (выявляются в одной системе организма). При этом чаще других встречаются пороки нервной трубки - 8,4-22,3% (пороки ЦНС составляют свыше 30% таких пороков). Затем следуют пороки сердца - 10,9-21,0%, пороки конечностей - 7,4-24,5%, пороки гениталий - 2,4-7,5%.

Пороки развития, одновременно выявляемые в двух системах организма и более, называются множественными пороками. Их частота составляет 7,9-18,2%.

Различия в показателях частоты врожденных пороков имеют региональные особенности, зависят от полноты учета, четкости понятия (что относить к ВПР), численного, национального и возрастного состава популяции, исторических, этнических и демографических факторов, географических и экологических условий, а также от продолжительности наблюдения за конкретным регионом.

Для изучения понятий, описания и учета БАР и МАР используются специальные методические разработки и учебные пособия: словари терминов, стандартизованная методика обследования пациентов с врожденной патологией, основанная на клинических, морфологических, антропометрических и других характеристиках (см. главу 17).

БАР обозначает стойкое морфофункциональное нарушение (см. главу 3). Как синонимы БАР применяются понятия: врожденный порок, порок развития.

Обычно БАР называют пороки, возникшие внутриутробно в результате нарушения эмбриогенеза или (намного реже) в результате нарушения фетогенеза, и уже совсем редко - развившиеся из-за нарушения постнатального формирования (созревания) органов, являющегося проявлением эндокринных расстройств (например, гипофизарная карликовость, гигантизм и акромегалия).

Вместе с тем, к БАР не следует относить постнатальные нарушения пропорций или размеров органов. Также не следует называть БАР уродством или уродливостью, ибо термин «уродство» носит скорее социальный характер (социальный урод, «выродок» общества: бандит, киллер, преступник, уголовник). Очевидно, что этот термин не должен применяться в медицине, где вместо него будет правильным использовать термин «больной человек».

В свою очередь, МАР (ее многочисленные синонимы - дизэмбриогенетический признак, стигма, дисгенезия, дисморфологическая черта, диспластическая стигма, микродегенеративный признак, микропризнак и др.), хотя и относятся к стойким морфологическим, а точнее к более тонким гистологическим изменениям, но не выходят за пределы границ нормы и не сопровождаются функциональными нарушениями. Поэтому медицинское значение МАР менее выражено, чем значение БАР.

Принципы классификаций

Известны несколько классификаций БАР, в основу которых положены разные принципы.

В частности, пороки различаются по последовательности возникновения в организме (первичные и вторичные дефекты), времени воздействия вызвавшего их тератогенного фактора, локализации и другим параметрам, что серьезно затрудняет их диагностику.

В таблице 13 приведена классификация пороков по этиологическому принципу, указаны их типы и частота.

Таблица 13. Классы, типы и частота БАР в зависимости от причины (%)

Классы	Всего	Генные		Мультифакториальные	При хромосомных болезнях	Средовые	Неясного генеза
		рецессивные	доминантные				
Изолированные	82	5,4	8,3	61,2	0,4	1,6	23,2
Множественные	18	8,3	8,7	3,5	47,8	1,1	30,5
Суммарно	100	5,9	8,4	50,8	8,9	1,5	24,5

Как следует из данных этой таблицы, выделены два класса БАР (изолированные и множественные), в каждом из которых по 6 подклассов:

- генные, наследуемые по аутосомно-рецессивному и аутосомнодоминантному типам (два подкласса);
- мультифакториальные аддитивные пороки (гены + факторы среды);
- пороки при хромосомных синдромах (генный и хромосомный дисбаланс);
- пороки экзогенного происхождения (факторы среды);
- пороки неустановленного генеза (не отнесены ни к одному из известных типов).

Зарубежные дисморфологи выделяют четыре типа клинически значимых врожденных дефектов развития.

Первый тип - это собственно порок развития («malformation») или морфологический дефект органа (большого участка тела), возникший в результате нарушений развития под действием внутренних причин. При этом подразумевается, что зачаток органа изначально аномален,

и его развитие не может идти по нормальному пути. К этому типу пороков, например, относятся пороки при хромосомных синдромах (полидактилия) и пороки, обусловленные генными мутациями (синдром Меккеля).

Второй тип - это дизрупция или морфологический дефект одного органа (большого участка тела), возникший в результате воздействия внешних факторов на изначально нормальный процесс развития.

Дизрупция - это синоним вторичного порока, поэтому в постнатальном периоде развития индивида бывает крайне трудно определить: является ли выявленный у него дефект первичным пороком или это дизрупция?

Например, аплазия лучевой кости при синдроме Холт-Орама - это порок, а при талидомидном синдроме - это дизрупция.

Третий тип - это деформация или аномальные форма, размер, положение части тела в результате воздействия внешних механических сил (недизруптивных) или внутренних сил на плод. При этом внешние силы могут привести к механическим сдвигам (например, уретры), уменьшению размеров и деформации (например, матки), а также к дефектам нервной, мышечной и (или) соединительной ткани плода. Внутренние силы могут обусловить гиподинамию плода, которая, в свою очередь, приведет к артрогрипозу, необычному положению конечностей или частей тела плода, уменьшению размеров конечностей, птеригиумам, отсутствию формирования сгибательных складок и другим типам деформаций вплоть до врожденного кифоза (кифосколиоза).

Деформации могут также возникать в постнатальном периоде, например асимметрия черепа у детей с врожденной гипотонией, долгое время лежавших в одной позе.

Среди других примеров: амниотические перетяжки (фиброзные тяжи) между плодом и амнионом, приводящие к специфическому синдрому, названному АДАМ-комплекс.

Четвертый тип - это дисплазия или ненормальная организация клеток в структуре тканей. Известны многочисленные примеры дисплазий: эктодермальная дисплазия, синдром Марфана, несовершенный остеогенез, синдром Элерса-Данлоса и др.

Следует отметить, что и за рубежом, и в России для объяснения (выражения) этиологических и патогенетических связей между разными типами аномалий развития были предложены следующие понятия: следствие, синдром и ассоциация.

Следствие - это тип множественных аномалий, возникших в результате одной известной или предполагаемой аномалии либо в результате действия механического фактора. Так, основной порок - *spina bifida* - может привести к следствиям: параличу нижних конечностей, атрофии мышц, косолапости, инфекциям мочевого тракта, поражению почек, запорам и дилатации кишечника.

Примером следствия, вызванного механическим фактором, может быть упомянутый выше артрогрипоз, патогенез которого связан с гиподинамией плода, которая, в свою очередь, может быть обусловлена разнообразными причинами (миопатия, нейропатия, поражение ЦНС, маловодие).

Другим примером следствия является спорадический аномалад Пьера Робена, при котором первичным пороком является микрогения, а его следствием будут остальные пороки и симптомы заболевания: глоссоптоз, уменьшение ротовой полости, препятствующие смыканию нёбных пластинок (в результате - расщелина нёба).

Следующий пример - синдром Поттер, при котором маловодие является патогенетическим механизмом, а этиологические факторы обусловлены генетическими причинами (аутосомно-рецессивный поликистоз почек) или механическими причинами (сдавление мочеточника). Результат - агенезия почек.

Важно подчеркнуть, что во всех случаях следствия наблюдается единый пусковой патогенетический механизм.

Синдром обозначает устойчивое сочетание двух или более пороков развития, выявляемых в разных системах организма. В связи с этим понятием следует вспомнить другое, сходное по названию понятие «клинический синдром» (наиболее выраженные симптомы отдельного заболевания или их группы, а также отдельные периоды болезни), существенно отличающиеся от понятия «тератологического синдрома».

Как известно, в основе тератологического синдрома всегда лежит одна причина, которая может быть генной мутацией, хромосомной абберацией или тератогеном.

Ссылка на одну причину используется только тогда, когда точно известно (или предполагается), что два порока развития и более патогенетически связаны между собой.

С другой стороны, если речь заходит о дефектах развития, не связанных между собой (этиологически и патогенетически), то применяется другое понятие - *ассоциация*, имеющее совершенно иное значение в сравнении с аналогичным понятием при

мультифакториальной патологии, где оно отражает наиболее высокую частоту полиморфного гена-маркера при определенном МФЗ (см. главу 22).

Как понятие тератологии, ассоциация обозначает неслучайное сочетание нескольких аномалий развития у двух или более индивидов, но не следствие и не синдром.

Практическое значение этого понятия заключается в том, что наличие одной аномалии развития, входящей в тератологическую ассоциацию, должно насторожить врача в плане поиска других аномалий развития, также в нее входящих. Например, выявление у новорожденного гипоплазии большого пальца кисти предполагает необходимость обследования на наличие признаков VATERL- ассоциации.

В тератологии при всем многообразии следствий, синдромов и ассоциаций известно все-таки мало типов ВПР, входящих в разные комплексы пороков.

Вместе с тем, один и тот же порок развития может быть изолированным, первичным или вторичным, может входить в симптомокомплекс моногенной болезни, тератологического или хромосомного синдрома.

Дифференциально-диагностическое значение малых аномалий развития

Для регистрации и учета МАР еще в XX в. была предложена стандартизованная методика, согласно которой МАР можно разделить на три группы: альтернативные, измерительные и описательные.

Альтернативная группа - это МАР, которые (как и грубые пороки) или есть, или их нет (папилломы, насечки, алопеция, дефекты скальпа и др.).

Измерительная группа - это МАР, определяемые абсолютным или относительным количественным значением (удлинение, укорочение, уменьшение, увеличение, смещение части тела или органа, изменение кривизны поверхности и др.). В этом случае, исходя из статистических закономерностей, следует принимать во внимание только МАР, у которых отклонение от среднего арифметического значения не укладывается в 2 сигмы.

Описательная группа - это МАР, в отношении которых трудно применить количественные методы изучения (например, изменения формы мягких тканей, цвета волос, кожи и т.п.). В этом случае

допустима их оценка в баллах: I балл - слабовыраженная МАР, II балла - четко определяемая МАР, III балла - резко выраженная МАР (с крайними значениями).

Следует отметить, что внимание тератологов всегда обращалось на дифференциально-диагностическое значение МАР при характеристике не только врожденной, но и наследственной патологии. Для большинства МАР характерна стабильность, отмечаемая уже в периоде новорожденности и не исчезающая с возрастом ребенка.

Для части МАР, напротив, характерно их изменение (вплоть до исчезновения) по мере роста и развития организма ребенка, т.е. возрастная динамика. Сюда, например, относятся такие признаки, как капиллярные гемангиомы шеи и поясничной области, высокое нёбо, седловидная форма носа, гипоплазия большого пальца на стопах, умеренные кожные синдактилии II и III пальцев ног.

Возрастная динамика отмечена также при эпиканте, расщелине язычка, сандалевидной щели, низко расположенных ушных раковинах, пигментации кожи.

Выделены различия в характеристике МАР у доношенных и недоношенных детей. Отмечена положительная корреляция некоторых МАР с продолжительностью гестационного возраста ребенка.

Установлена зависимость характеристики ряда МАР от национальной принадлежности пациента (выступающая верхняя губа, ширина рта, форма носа, эпикант и др.). Например, эпикант встречается у 60-65% мужчин, проживающих в странах Азии, у 57% татар Поволжья, 25% казахов; редко встречается в Австралии, Индии и Индонезии; практически не встречается у русских.

Другой пример - узкая глазная щель, характерная для монгольской расы.

В качестве маркеров ряда наследственных заболеваний и синдромов множественных ВПР могут рассматриваться комплексы из 4, 5 МАР и более, т.е. во внимание принимается *количество МАР*. Например, полидактилия, гипертелоризм глаз и сосков, дополнительные соски - эти МАР предполагают наличие у пациента пороков мочевыводящей системы.

Следующий пример - расщелина губы и нёба, для которой характерны: аномалии фронтальных зубов верхней челюсти, атипичная форма верхних боковых резцов и клыков, высокое готическое твердое нёбо и короткое мягкое нёбо, костные изменения нёбного сегмента (на рентгенограмме), субмукозная расщелина или раздвоение язычка,

прогения, прямой или перекрестный прикус, асимметрия носовой перегородки, рубец на верхней губе и альвеолярном отростке, несимметричное снижение крыльев носа. Еще пример - тетрада Фалло, для которой характерны: антимонголоидный разрез глаз,

эпикант, гипертелоризм, плоская переносица, высокое нёбо, дистрофия зубов, неправильный прикус, борозда на языке, диспластичные ушные раковины, необычная форма черепа, клинодактилия и разная длина мизинцев рук, плоскостопие.

Помимо количества МАР, большое диагностическое значение имеет *сочетание МАР*. Например, при синдроме Варденбурга сочетаются: телекант, гиперхромия радужки, сросшиеся брови, белая прядь волос надо лбом; при синдроме Дауна - монголоидный разрез глаз, эпикант, поперечная ладонная складка, брахидактилия, клинодактилия, сандалевидная щель.

Вместе с тем, наибольшее диагностическое значение имеет *качество МАР*, т.е. выделение таких признаков, которые среди здоровых пациентов почти не встречаются: крыловидные складки шеи (синдромы Шерешевского-Тернера и Нунан), постаксиальная полидактилия (синдром Барде-Бидля), гипоплазия или аплазия грудного соска на одной стороне (синдром Поланда), вертикальные насечки на мочке уха (синдром Беквитта-Видемана).

ОТДЕЛЬНЫЕ НОЗОЛОГИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ СИНДРОМОВ МНОЖЕСТВЕННЫХ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ

Синдром Арского-Скотта

Минимальные признаки: гипертелоризм, брахидактилия, шалевидная мошонка, низкий рост к концу первого года жизни (отставание в росте в 90% случаев).

Фенотип: круглое лицо, клиновидный рост волос на лбу или «мыс вдовы» (70%), гипертелоризм (95%), широкая переносица (85%), короткий нос с вывернутыми наружу ноздрями (94%), широкий фильтр (97%), антимоногоидный разрез глаз (55%), птоз (50%). Глазные аномалии: офтальмоплегия, косоглазие, астигматизм, увеличенная роговица. Также выявляются: гипоплазия верхней челюсти, относительная прогения, легкая складка под нижней губой,

аномалии ушных раковин, разболтанность суставов, брахидактилия и клинодактилия мизинцев, неполная кожная синдактилия пальцев рук, переразгибание в проксимальных межфаланговых суставах с одновременным сгибанием в дистальных, короткие пятые пальцы с единственной сгибательной складкой, поперечная складка ладони, широкие стопы.

Наиболее характерна шалевидная мошонка (81%). Иногда отмечаются крипторхизм, фимоз, расщепление мошонки. Описаны паховые грыжи (66%). УО умеренно выражена у 14% пациентов. Аутосомнорецессивный или Х-сцепленный рецессивный тип наследования. Во втором случае ген локализован в сегменте Xq13.4.

Акрофациальный дизостоз Нагера

Минимальные признаки: аплазия или гипоплазия лучевой кости, лучелоктевой синостоз, гипоплазия или аплазия большого пальца ноги, гипоплазия нижней челюсти, антимоногоидный разрез глаз, стеноз или атрезия наружного слухового прохода.

Фенотип: признаки черепно-лицевого дизостоза - синдром Франческетти (антимоногоидный разрез глаз, недоразвитие ресниц, колобома нижнего века, резкая гипоплазия нижней челюсти, укорочение твердого нёба, гипоплазия зачатков коренных зубов, стеноз и атрезия наружного слухового прохода, иногда преарикулярные выросты, деформация и низкое расположение ушных раковин) в сочетании с недоразвитием I пальца кисти, костей запястья, пясти, а также укорочением дистальных отделов предплечий, гипоплазией или аплазией лучевой кости. При отсутствии I пальца II палец

противопоставлен остальным и может иметь удвоенную дистальную фалангу. Иногда наблюдается искривление V пальца, ограничение подвижности в локтевом суставе, отсутствие II пальца. Психическое развитие замедленное. Предположительно аутосомно-доминантный тип наследования.

Акроцефалополисиндактилии

Минимальные признаки: акроцефалия, синдактилия разной степени. Выделяют несколько фенотипов.

- Синдром Апера, тип I, акроцефалосиндактилия. Отмечается синостоз костей черепа разной степени (в основном венечного шва) в сочетании со сфеноэтомидомаксиллярной гипоплазией, плоским лбом, гипертелоризмом, антимонголоидным разрезом глаз, запавшей переносицей, прогнатизмом, полным сращением

II-V пальцев кистей и стоп. Популяционная частота - 1:160 тыс., аутосомно-доминантный тип наследования.

- Синдром Карпентера, акроцефалополисиндактилия, тип II. Характеризуется акроцефалией, специфическим лицом (телекант, эпикант, плоская переносица, большие щеки, низко расположенные ушные раковины, гипоплазия нижней челюсти), брахидактилией, синдактилией больших пальцев ног. В зрелом возрасте - ожирение, УО. Аутосомно-рецессивный тип наследования.

- Синдром Ноака, акроцефалополисиндактилия, тип V. Характеризуется акроцефалией в сочетании с широкими дистальными фалангами больших пальцев кистей и стоп. Возможны синдактилия II-III пальцев кистей и II-IV пальцев стоп, добавочные большие пальцы стоп.

- Синдром Пфейфера-Робина, акродизостоз. Характеризуется маленькими кистями с короткими толстыми пальцами и короткими ногтями - «трехзубчатая кисть», складками кожи и припухлостью на тыльных поверхностях кистей и стоп, прогрессирующим артритом в дистальных отделах конечностей, гипопластичным коротким и плоским носом с поднятым вверх кончиком и широкими ноздрями, гипоплазией верхней челюсти, прогнатизмом, открытым прикусом, задержкой умственного развития. Аутосомно-рецессивный тип наследования.

- Синдром Сэтре-Чотзена, тип III. Наблюдается краниостеноз разной степени, приводящий к асимметрии черепа. Характерны: выступающие лобные и теменные бугры, птоз, гипертелоризм, антимонголоидный разрез глаз, косоглазие, сращение мягких тканей II-III пальцев рук и ног, брахидактилия.

Синдром Боуэна-Конради

Минимальные признаки: долихоцефалия, клювовидный нос, микрогения, тугоподвижность суставов.

Фенотип: гипотрофия плода, долихоцефалия, выступающий клювовидный нос, деформация ушных раковин, микрогения, камптодактилия и клинодактилия, тугоподвижность в тазобедренных суставах, «стопа-качалка». Редко выявляются подковообразная почка, микроцефалия, эктопия слизистой желудка в пищевод, недоразвитие мозжечка, крипторхизм.

Тип наследования - аутосомно-рецессивный.

Синдром Ван Дер Вуда

Минимальные признаки: мукозные кисты нижней губы, расщелина верхней губы и/или нёба.

Фенотип: две асимметрично расположенные кисты (ямки) на слизистой оболочке нижней губы и расщелина верхней губы и/или нёба. Иногда встречается только одна ямка, иногда - фистула с небольшим количеством слизистого секрета. Популяционная частота - 1:80-100 тыс.

Ген локализован в сегменте 1q32. Аутосомно-доминантный тип наследования с пенетрантностью 80% и варьирующей экспрессивностью.

Синдром Вильямса

Минимальные признаки: «лицо эльфа», надклапанный стеноз аорты или легочной артерии, гиперкальциемия.

Фенотип: малая длина и масса тела при рождении (в среднем 2700 грамм); «лицо эльфа» - эпикант, отечность век, короткий нос с открытыми вперед ноздрями, широкая верхняя и маленькая нижняя челюсть, полные щеки, открытый рот, оттопыренные уши.

Типичное лицо формируется к 4-му году жизни. Часто встречаются голубые радужки со звездчатым рисунком.

Со стороны сердечно-сосудистой системы: недостаточность митрального клапана, надклапанный стеноз аорты, стеноз легочной артерии, в 50% случаев - дефекты перегородок сердца.

Возможны хриплый голос, косоглазие, краниостеноз, частичная адонтия, кифосколиоз, паховые грыжи, гиперхолестеринемия. В возрасте 8-18 мес иногда выявляется гиперкальциемия, приводящая к анорексии, гипотонии, запорам, полидипсии, полиурии, почечной недостаточности, рвоте. Заболевание прогрессирует с возрастом, развиваются кифосколиоз, лордоз, тугоподвижность суставов, патология сердца, стеноз уретры.

Наблюдаются УО разной степени и психические нарушения.

Популяционная частота - 1:10 тыс. Предполагается аутосомнодоминантный тип наследования

Синдром Дубовица

Минимальные признаки: пренатальная и постнатальная задержка физического и умственного развития, микроцефалия, необычное лицо, экзематозные поражения кожи.

Фенотип: резкая внутриутробная гипотрофия, прогрессирующая микроцефалия, преобладание дефицита массы тела, скошенный лоб, гипоплазия надбровных дуг, широкая переносица, птоз (часто односторонний), эпикант, телекант, блефарофимоз, микрогнатия, высокое нёбо, расщелина нёба, нарушение прорезывания зубов, множественный кариес. Голос хриплый, грубый. Волосы и брови редкие. Иногда - клинодактилия, плоскостопие, пилонидальные ямки (эпителиальные копчиковые ходы, открывающиеся в межъягодичной складке), крипторхизм, гипоспадия, гипоплазия половых губ. Важнейший признак - шелушение кожи на лице и сгибательных поверхностях конечностей (расценивается как экзема).

Характерны: диарея, плохой аппетит, рвота. Тип наследования - аутосомно-доминантный.

Синдром Корнели де Ланге

Минимальные признаки: грубая задержка физического и психомоторного (умственного) развития, микроцефалия, сиофриз (сросшиеся брови), длинный фильтр, вывернутые наружу ноздри, тонкая и загнутая внутрь верхняя губа, микромелия, гипертрихоз.

Фенотип: микробрахицефалия, деформированные ушные раковины, сиофриз, тонкие брови, длинные загнутые ресницы, маленький нос с открытыми вперед ноздрями, атрезия хоан, длинный выступающий фильтр, микрогения, тонкая верхняя губа, рот в виде полумесяца, высокое арковидное нёбо, иногда - расщелина нёба. Среди глазных аномалий: астигматизм, атрофия или колобома зрительного нерва, косоглазие, миопия. Среди пороков конечностей: акромикрия, тугоподвижность локтевых суставов, фокомелия и олигодактилия, клинодактилия V пальца; редко выявляются гипоплазия лучевой кости и короткие I метакарпальные кости. Со стороны кожи: гипертрихоз, мраморная кожа, гипоплазия сосков. Отмечаются мышечный гипертонус, слабый высокий голос, судороги. Описаны пороки внутренних органов: порок сердца, поликистоз почек, гидронефроз, удвоение и неполный поворот кишечника, пилоростеноз, паховые и диафрагмальные грыжи, крипторхизм, гипоплазия гениталий. Типичны рецидивы респираторных инфекций.

Популяционная частота - 1:12 тыс. Тип наследования не установлен.

В ряде случаев у больных выявляются микрохромосомные перестройки в участке 3q26.3.

Синдром Нунан

Минимальные признаки: крыловидные складки кожи на шее, аномалии грудной клетки, крипторхизм, пороки правых отделов сердца.

Фенотип: гипертелоризм, эпикант, антимонголоидный разрез глаз, птоз, микрогнатия, низкое расположение ушных раковин, складчатые завитки на ушных раковинах, арковидное нёбо, расщелина язычка, открытый прикус и другие нарушения прикуса, миопия, кератоконус, косоглазие, низкий рост волос на затылке. Шея короткая, широкая, имеет крыловидные складки кожи. Грудная клетка щитообразная, с широко расставленными сосками, грудина выступает в проксимальной и западает в дистальной части. Характерны: низкий рост, вальгусная деформация локтевых суставов, иногда сочетающаяся с минимальными деформациями кистей и стоп. Нередки кифосколиоз, аномалии позвоночника. Возможен периферический лимфатический отек, реже - гиперэластическая кожа и келоидные рубцы. В 80% случаев выявляются пороки правых отделов сердца и крупных сосудов: стеноз легочной артерии, открытый артериальный проток, дефекты межжелудочковой и межпредсердной перегородок, тетрада Фалло. Описаны случаи гипертрофии левого желудочка и межжелудочковой перегородки. У ряда больных отмечаются пороки мочевыводящей системы: обструктивная уропатия, гидронефроз, удвоение лоханок, гипоплазия почек, а также гирсутизм.

У большинства мужчин выявляется одноили двухсторонний крипторхизм. УО выражена у 61% больных.

Характерен аутосомно-доминантный тип наследования.

Клинические формы гермафродитизма

Клинически выделяют истинный гермафродитизм и псевдогермафродитизм (см. главу 16). Отличие между формами зависит от природы зародышевой ткани.

В случае истинного гермафродитизма имеются как мужские, так и женские гениталии, ибо одновременно присутствуют оба типа гонад. Обычно больше мужских гонад, и

благодаря этому наружные половые органы более мужские (на 70-80%), чем женские. Со стороны внутренних половых органов: персистирование мюллерова и вольфова протоков, фаллопиевы трубы либо гипоплазированы, либо их нет. В зависимости от расположения гонад выделяют следующие формы истинного гермафродитизма:

- латеральная (яичники расположены на одной стороне, тестикулы - на другой);
- билатеральная (на обеих сторонах расположены яичники и тестикулы);
- унилатеральная (на одной стороне расположены яичники и тестикулы, на другой - оба тестикула).

Частота встречаемости этих форм - соответственно 40, 20 и

40%.

Цитогенетически выявляются следующие кариотипы: 46,XX (50%); 46,XY (20%); мозаичные клоны: XO/XY; XX/XY (30%).

При псевдогермафродитизме также присутствуют и мужские, и женские гонады. Соответственно выявляются следующие формы: хромосомная аномалия - 45,XO/46,XY; генная мутация, наследуемая по аутосомно-рецессивному типу (синдром тестикулярной феминизации или фенотипически нормальная женщина с кариотипом мужчины - 46,XY); генная мутация - 46,XX / 46,XY. При этом синдроме определяются рудиментарные яичники с разной локализацией; наружные половые органы сформированы по женскому типу, но нет матки. В период полового созревания у такой больной может наблюдаться как полная, так и неполная (синдром Рейнфайштейна) феминизация. Во втором случае причиной является X-сцепленная рецессивная или аутосомно-доминантная мутация.

В случае мужского псевдогермафродитизма выделяют три клинические формы: андронидная (наружные половые органы развиты по мужскому типу, но есть и женские наружные половые органы), евнухоидная (наружные половые органы не определяются или недоразвиты; клинически это синдром Клайнфельтера) и тернеровская (наружные половые органы не определяются либо присутствуют и мужские, и женские; клинически это синдром Шерешевского-Тернера).

Выделяют также две клинические формы дисгенезии гонад: чистую и смешанную. В первом случае выявляются женский фенотип при мужском кариотипе (мозаицизм 45,XO / 46,XY), первичная аменорея, слабо выраженные вторичные половые признаки, рудиментарные гонады. Во втором случае выявляется женский фенотип, но с признаками синдрома Шерешевского-Тернера (женские наружные половые органы, гипертрофия клитора, верилизация в пубертате). Гонады локализованы интраабдоминально и симметрично (с одной стороны гонады, с другой - яичники).

В случае женского псевдогермафродитизма, как правило, наблюдается вторичная верилизация плода женского пола при мужском кариотипе. Это имеет место при АГС, обусловленном аутосомнорецессивным дефектом 21-гидроксилазы, необходимой для синтеза кортизола (см. главу 14).

ГЛАВА 24 ХРОМОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ

Характеристика и частота в популяции

Хромосомные болезни (ХБ) или синдромы - одна из форм наследственной патологии, характеризующаяся наименьшей частотой встречаемости в популяции (до 1%). Это, как правило, спорадические случаи.

Как и врожденные болезни, ХБ возникают внутриутробно в результате нарушений числа или структуры хромосом соматических клеток (аутосомные синдромы) и половых клеток (гоносомные синдромы). В расчете на 1000 новорожденных ХБ выявляются у 7-8 детей, и в структуре общей смертности детей до 5 лет на их долю приходится 3-4%. Если в 1959 г. было известно всего четыре хромосомных синдрома, то теперь насчитывается около 100, и их число продолжает увеличиваться. К хромосомным нарушениям отнесены почти 900 типов перестроек, многие из которых (из-за малого числа наблюдений) пока не выделены в самостоятельные синдромы. Между тем подсчитано, что на 100 больных с ХБ у 95 человек будут выявляться синдромы, обусловленные геномными (числовыми) мутациями (в том числе 75% составят больные с синдромом Дауна), и только 5 человек будут иметь синдромы, обусловленные структурными мутациями хромосом.

Классификация ХБ и связь хромосомного дисбаланса с нарушениями развития организма

Наиболее распространенной классификацией ХБ считается классификация на основе хромосомного дисбаланса, связанного с геномными мутациями (увеличением или уменьшением числа) аутосом и гоносом, а также со структурными мутациями аутосом.

Сопоставление результатов цитогенетического и клинического обследования больных с хромосомными синдромами позволило выделить ряд закономерностей.

- Хромосомный дисбаланс связан с разными нарушениями развития организма.
- Объем и тип хромосомного дисбаланса влияют на степень выраженности нарушений развития организма. При этом:
 - полные трисомии и моносомии сказываются на развитии более выражено, чем частичные, и встречаются реже, чем мозаичные трисомии и моносомии;
 - дисбаланс по крупным хромосомам проявляется тяжелее, чем по мелким;
 - недостаток хромосомного материала обуславливает развитие более тяжелых нарушений, чем его избыток.
- Вовлеченность в патологический процесс индивидуальных хромосом различна. Чем больше в составе хромосомы генетически неактивного гетерохроматина, тем чаще встречаются перестройки такой хромосомы в популяции живорожденных детей. Этим объясняется наибольшая частота полных трисомий по хромосомам 8, 9, 13, 18, 21, X и Y.
- Специфические клинические проявления связаны с незначительными по размерам хромосомными сегментами. Например, специфические признаки синдрома Дауна вызваны трисомией сегмента 21q21, синдрома Эдвардса - трисомией сегмента 18q11, синдрома «кошачьего крика» - делецией (утратой) сегмента p15 на хромосоме 5.
- Частота ряда перестроек аутосом у детей зависит от возраста и пола родителей. Для женщин в возрасте 35 лет и старше вероятность рождения ребенка с трисомией по хромосомам 13, 18 и 21 значительно превышает таковую для женщин в возрасте 19-24 года. Напротив, молодые женщины в возрасте до 19 лет чаще рожают девочек с

моносомией по X-хромосоме. Случаи синдрома Дауна в результате нерасхождения хромосомы 21 в мейозе у женщин встречаются в 3 раза чаще, а в первом делении мейоза - в 5 раз чаще, чем у мужчин. Структурные перестройки хромосом значительно чаще передаются через женские, чем через мужские гаметы.

- В семьях, где уже был отмечен случай рождения ребенка со структурной хромосомной перестройкой, существует повышенный риск повторного рождения детей с ХБ. Следует отметить, что эти закономерности в основном относятся к аутосомным хромосомным синдромам.
- Клинические проявления у больных с синдромами, обусловленными нарушениями числа Y- и X-хромосом, выражены в меньшей степени, чем при нарушении числа аутосом. В случае Y-хромосомы, в которой идентифицировано 92 гена, клинические проявления почти не наблюдаются даже при тройной

дозе Y-хромосомы или полной утрате ее длинного плеча, ибо Y-хромосома в основном состоит из гетерохроматина. В случае X-хромосомы, с которой сцеплены около 300 генов, обеспечивается механизм компенсации «лишних хромосом» (телец Бара) как при двукратно увеличенной дозе генов (женский кариотип в норме представлен двумя X-хромосомами), так и при трехкратном и большем увеличении числа X-хромосом (синдром трипло-X) и полисомии по X-хромосоме. При этом тельца Бара по своим морфологическим признакам становятся гетерохроматическими, поздно реплицируются и, как правило, почти не проявляются. Вместе с тем, тяжесть клинического проявления прямо связана с ростом количества «лишних хромосом» (см. ниже).

Клинические признаки

Клинические признаки ХБ делятся на три группы.

- *Первая группа* - это признаки, позволяющие заподозрить аномалии хромосом (например, физическое и психическое недоразвитие, черепно-лицевой дисморфизм, карликовость, пороки развития внутренних органов и др.).
- *Вторая группа* - это признаки, чаще всего встречающиеся при некоторых хромосомных синдромах. Например, при синдроме Дауна часто встречаются монголоидный разрез глаз, макроглоссия, «обезьянья складка» на ладонях. При синдроме Эдвардса в 90% случаев встречается долихоцефалическая форма черепа и в 96% случаев - флексорное сгибание кисти. При синдроме Патау в 70% случаев встречаются расщелина верхней губы и нёба, микрофтальмия, поликистоз почек, полидактилия.
- *Третья группа* - это признаки, патогномоничные для конкретного хромосомного синдрома. Например, при синдроме «крика кошки» или утраты части короткого плеча хромосомы 5 отмечается характерный крик ребенка, напоминающий кошачье мяуканье, при синдроме де Груши - алопеция.

Показания для цитогенетической диагностики

При подозрении на ХБ на цитогенетическое исследование должны направляться:

- больные с множественными ВПР и МАР;
- больные с олигофренией в сочетании с множественными ВПР и МАР;

- родители умерших детей, если у детей были множественные ВПР или хромосомные синдромы;
- братья и сестры больного пробанда и другие родственники детородного возраста в случае выявления у пробанда структурной перестройки, а у матери или отца пробанда - случаев носительства сбалансированной семейной транслокации;
- женщины, у которых в анамнезе отмечены повторные спонтанные аборты, случаи мертворождения или рождения детей с множественными ВПР;
- пациенты с задержкой полового развития, дисгенезией гонад, аменореей, первичным бесплодием;
- пациенты с семейными формами хромосомных синдромов.

ОТДЕЛЬНЫЕ НОЗОЛОГИИ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ХРОМОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Аутосомные синдромы

Синдром Дауна

Первое клиническое описание синдрома Дауна относится к 1866 г. Частота в популяции - 1:600-650 новорожденных. Среди умственно отсталых детей выявляется 10-12% больных с синдромом Дауна. При цитогенетическом анализе выделяют три формы: простая (регулярная) трисомия по хромосоме 21, встречается в 95% всех случаев синдрома, кариотип: 47, XX,+21; транслокация хромосомы 21 на другие хромосомы (чаще на 15, реже на 14, еще реже на 21, 22 и Y-хромосому) - 4% случаев, кариотип: 46, XY, t(21;15)(q21q15); мозаичный вариант синдрома - 1%, кариотип: 46, XX - 75% / 47, XX -

Выявление случаев семейных транслокаций имеет важное значение для МГК. Чаще всего среди семейных перестроек хромосом обнаруживаются частичные моно- и трисомии. Очень редко ребенок может унаследовать подобную транслокацию от отца; при этом прогноз будет также неблагоприятный.

Вероятность проявления у ребенка транслокации 21q21q равна

100%.

При мозаичной форме синдрома выраженность фенотипа зависит от доли трисомных клеток в составе аномального кариотипа пробанда: чем их будет больше, тем более будет выражен патологический фенотип.

Синдром Патау

Синдром Патау или трисомия по хромосоме 13 встречается с частотой 1:6000 новорожденных. Цитогенетически различают три формы: трисомная (75%), транслокационная (20%) и мозаичная

(5%). Фенотип включает триаду признаков: микрофтальм, расщелина верхней губы и нёба, полидактилия. Черепно-лицевой дисморфизм у пробанда характеризуется микроцефалией, неправильной конфигурацией черепа (вплоть до тригоноцефалии), скошенным узким лбом, раскрытыми широкими родничками и межкостными швами, дефектами скальпа, узкими горизонтальными глазными щелями, двусторонним микрофтальмом (иногда анофтальм или циклопия). Нос плоский и широкий, переносье западающее. Имеется одноили двусторонняя расщелина верхней губы, нередко

сочетающаяся с расщелиной нёба. Ушные раковины низко расположены. Наблюдаются внутриутробная гипотрофия, флексорное сгибание кистей, «стопакачалка», отсутствие или удвоение позвонков, гиперплазия крестца, пороки внутренних органов (врожденный порок сердца, поликистоз почек, гидронефроз, незавершенный поворот кишечника, подвижная слепая кишка, гетеротопия тканей селезенки в поджелудочную железу, крипторхизм, аномалии мошонки, гипертрофия клитора, двурогая матка, удвоенное влагалище).

ЦНС поражается во всех случаях. Морфологически выделяют: аринэнцефалию (сочетается с микроцефалией, аплазией или гипоплазией мозолистого тела и зрительных нервов); голопрозэнцефалию (сочетается с циклопией, цебоцефалией); гипоплазию червя мозжечка. Дерматоглифика включает «обезьянью складку», аксиальный трирадиус, высокую частоту тибиальных и фибулярных петель на большом пальце ноги.

Продолжительность жизни больных резко снижена. Обычно дети погибают в первые дни или недели жизни.

Синдром Эдвардса

Синдром Эдвардса или трисомия по хромосоме 18 встречается с частотой 1:7000. Мозаичная форма - 10% случаев, транслокационная форма встречается крайне редко.

Фенотип включает: выраженную задержку роста, множественные МАР (грубые пороки нечистоты), гипоплазию мышц и подкожной клетчатки. Черепно-лицевой дисморфизм: череп долихоцефалической формы, с выступающим затылком, межвисочное расстояние уменьшено, лобные кости в области родничка запавшие, переносица тонкая, выступающая, нос вздернут («птичий профиль» лица), короткие и горизонтально расположенные глазные щели, часто - двусторонний эпикант, микрофтальм. Ушные раковины маленькие, низко расположены, деформированы и вытянуты в горизонтальном направлении.

Мочка и козелок отсутствуют, наружный слуховой проход сужен либо отсутствует. Выявляются избыточная кожа на затылке, короткая шея и грудина, флексорное сгибание кисти с наложением указательного пальца на III, а V пальца на IV; «стопа-качалка», врожденный вывих бедра, укорочение большого пальца на стопах, синдактилия; врожденные пороки сердца и крупных сосудов. Редко встречаются пороки наружных половых органов. Дерматоглифика характеризуется увеличением дуг на пальцах, часто встречается четырехпальцевая складка, аксиальный трирадиус.

Продолжительность жизни резко снижена: 30% детей умирают на первом и 50% - на втором месяце жизни, до года доживают 10% больных.

Синдром трисомии 9p

Синдром трисомии по короткому плечу хромосомы 9 или синдром Реторе - это вторая по частоте встречаемости (после синдрома Дауна), но уже не полная, а частичная трисомия.

Этот синдром наиболее распространен среди детей-олигофренов. Большая часть случаев связана с транслокациями у родителей и несколько случаев - с транслокациями de novo.

Как правило, в транслокацию вовлекаются хромосомы 15 и 22.

Описаны случаи «чистой» (без транслокаций) трисомии 9p, а также случаи, ставшие результатом дупликаций изохромосом по короткому плечу или результатом центрического разрыва.

Фенотип характеризуется множеством выраженных признаков: круглый череп, микроцефалия или брахицефалия, большой широкий родничок, переходящий в лобный шов, микроили энофтальм, смещение зрачка к внутреннему углу радужки, миоз (до булавоочковидного зрачка), страбизм с нарушением рефракции, гипертелоризм, эпикант, антимонголоидный разрез глазных щелей, широкий кончик носа, ноздри обращены вниз. Верхняя губа очень короткая, обнажены клыки, «конские зубы», нижняя губа вывернута, углы рта опущены. При открывании рта выявляется выраженная асимметрия лица.

Ушные раковины большие, нормально или низко расположенные. Шея короткая, иногда выявляются крыловидные складки кожи. Грудная клетка воронкообразная, соски широко расставлены. Наблюдаются диастаз прямых мышц живота, грыжи, деформация позвоночника, гиперлордоз, стрии на животе. Руки короткие, ладони длинные, брахимезофалангия, клинодактилия. Ступни деформиро-

ваны. Ногти диспластичные, когтеобразные или гипоплазированные. Волосы редкие или вообще отсутствуют. У каждого четвертого больного обнаруживается врожденный порок сердца.

Дерматоглифика: четырехпальцевая складка, увеличение дуг и снижение общего гребневого счета, отсутствие или слияние подпальцевых трирадиусов.

Задержка умственного развития выявляется уже с первого месяца жизни. Физическое развитие задержано незначительно. При отсутствии грубых пороков продолжительность жизни обычная.

Синдром трисомии 8

Синдром трисомии 8 встречается с частотой 1:50 тыс. человек. Преобладает мозаичная форма (84%). Клинические различия между мозаичной и трисомной (16%) формами отсутствуют. Дети обычно рождаются доношенными, со средней массой тела.

Фенотип включает черепно-лицевой дисморфизм: большой квадратный череп, выступающий лоб с выраженными лобными буграми, скафоцефалия. Встречаются гипертелоризм, косоглазие, широкая спинка носа, микро- и прогнатия, высокое нёбо, расщелина твердого и мягкого нёба, вывернутая нижняя губа, диспластичные низко расположенные ушные раковины. Шея короткая и широкая, с низким ростом волос, волосы тонкие и вьющиеся. Характерны множественные изменения опорнодвигательного аппарата, ранняя оссификация одних костей и задержка окостенения других. Туловище длинное, диспластичный скелет: ребра узкие, дополнительные ребра, слияние ребер и позвонков, сколиоз, кифоз, *spina bifida* в грудном или поясничном отделах позвоночника, слияние позвонков, запавшая грудина. Движения в суставах (особенно коленных) резко ограничены, ибо часто отсутствует надколенник. Пальцы рук и ног длинные, тонкие, диспластичные. Характерны пороки мочевой системы: гидронефроз, гидроуретер, агенезия почки, подковообразная почка, двусторонний уретральный рефлюкс. Наблюдаются гипоплазия гениталий, крипторхизм, атрофия тестикул и др.

Дерматоглифика: глубокие складки на ступнях и ладонях, увеличение количества дуг и ульнарных петель со снижением общего гребневого счета на пальцах.

Выражена задержка физического и интеллектуального развития.

Синдром «кошачьего крика»

Синдром делеции части короткого плеча хромосомы 5 (сегмент p13). Частота синдрома - 1:50 тыс.; среди детей с задержкой умствен-

ного развития - 1:350. Описаны мозаичные формы.

Дети с этим синдромом, как правило, рождаются после нормально протекавшей беременности. В неонатальном периоде состояние у них резко ухудшается: имеют место приступы цианоза, инспираторный стрidor (удлиненный и прерывающийся выдох), снижение двигательной активности, угнетение сосательного рефлекса, рвота.

Фенотип характеризуется монотонным или резким, слабым или высоким криком, похожим на кошачье мяуканье. С возрастом крик исчезает.

Выявляется грубое физическое и интеллектуальное недоразвитие. Выражен черепно-лицевой дисморфизм (особенно в первые два года жизни): микроцефалия, долихоцефалическая или мезоцефалическая форма черепа, лунообразное лицо, эпикант, катаракта, узкие глазные щели, антимонголоидный разрез глаз, страбизм, вдавленное переносье. Зубы неправильно расположены, передние резцы выступают вперед, фильтр короткий, рот широкий, полная нижняя губа. Часто наблюдаются врожденные пороки сердца, почек, косолапость, крипторхизм, клинодактилия мизинцев, кожная синдактилия II и III пальцев ног и некоторые другие признаки.

Синдром Вольфа-Хиршхорна

Синдром Вольфа-Хиршхорна или синдром делеции короткого плеча хромосомы 4 встречается с частотой 1:100 тыс. (описано более 100 случаев). Полагают, что за этот синдром ответственен сегмент 4p16.

Фенотип включает следующие признаки: пренатальная гипотрофия, умеренная микроцефалия с асимметрией черепа, дефекты скальпа по средней линии черепа, гемангиомы, выступающие надбровные дуги, широкое межбровье, высокий лоб с глубокой кожной складкой, расходящийся страбизм, эпикант, птоз, антимонголоидный разрез глаз, гипертелоризм, клювовидный нос с широким основанием, короткий фильтр с опущенными углами рта, расщелина губы и нёба, микрогнатия. Ушные раковины низко расположены. Шея короткая и тонкая, туловище вытянутое, аномалии ребер и позвоночника (расщелины, недоразвитие тел и дужек позвонков в шейном и пояснично-крестцовом отделах), тонкие конечности, длинные первые пальцы кистей, деформированные стопы. Нередко выявляются пороки сердца, мочеполовой системы, пороки ЦНС. Характерны отставание в физическом развитии, судорожные припадки и грубая задержка умственного развития.

Прогноз неблагоприятный и зависит от тяжести пороков внутренних органов. Обычно больные умирают в возрасте до одного года, но известен случай диагностики синдрома у человека 20 лет.

Синдром частичной моносомии 13q-

Синдром частичной моносомии 13q- или синдром Орбели, встречается с частотой 1:100 тыс. (описано более 100 случаев).

Фенотип связан либо с образованием на длинном плече хромосомы 13 терминальной или интерстициальной делеции сегмента q14, либо с утратой этого сегмента в результате образования кольцевой хромосомы 13. Может наблюдаться мозаицизм по этим перестройкам хромосом.

Цитогенетически и фенотипически выделяют четыре варианта синдрома:

- r13, без патологии большого пальца руки;

- r13, отсутствие большого пальца руки;
- 13q-, патология большого пальца руки и ретинобластома;
- 13q-, без патологии большого пальца и ретинобластомы. Фенотип характеризуется: сочетанием микроцефалии с триго-

ноцефалией и явлениями краниостеноза. Лицо асимметричное, широкая выступающая спинка носа (переходит без впадины на лобную кость - «греческий профиль»), гипертелоризм, эпикант, микрофтальмия, птоз, колобома радужки и сетчатки, катаракта. Рот небольшой, верхняя губа короткая, «зубы кролика», нёбо высокое, подбородок маленький, большие диспластичные ушные раковины. Шея короткая, иногда с крыловидными складками кожи.

Наблюдаются: неправильное расположение пальцев рук и ног, синдактилия, клинодактилия мизинцев рук, аномалии ногтей, косолапость, вывих тазобедренных суставов. У мальчиков выявляются: крипторхизм, гипоспадия, эписпадия, недоразвитие мошонки и полового члена. Резко задержано психомоторное и физическое развитие.

Продолжительность жизни больных зависит от наличия грубых пороков развития (обычно она не более года).

При морфологическом исследовании: аринэнцефалия, аплазия или гипоплазия мозжечка и мозолистого тела, гидроцефалия. Вместе с тем, описаны случаи стертой симптоматики у больных старше 40 лет.

Синдром моносомии 18p-

Синдром моносомии 18p- или синдром де Груши, встречается с частотой 1:60 тыс. В большинстве случаев возникает в результате делеции, возникшей в гаметогенезе у одного из родителей. Известны варианты мозаичной формы синдрома.

Фенотип включает: низкорослость, краниофациальный дисморфизм (маленькая окружность черепа без истинной микроцефалии, горизонтальные глазные щели, микрофтальмия, катаракта, колобома, широкая и уплощенная переносица, гипертелоризм, птоз, эпикант, страбизм, короткая верхняя губа, плоские и широкие края губ, широкий фильтр). Ушные раковины низко расположены, деформированы, аплазия противокоселка. Шея короткая, с низким ростом волос. Грудная клетка вдавленная, широко расставленные соски. Отмечены клинодактилия мизинцев, плоскостопие, синдактилия, «стопа-качалка».

Часто выявляются пороки сердца и крупных сосудов (открытый артериальный проток, стеноз аорты, желудочковая гипертрофия), пороки половых органов (тестикулярная эктопия, гипоспадия, маленький пенис). Во многих случаях наблюдается алопеция (часто тотальная).

С учетом поражения ЦНС больные могут быть разделены на две группы: с грубой патологией мозга (аринэнцефалия или циклопия) и без таковой. Продолжительность жизни резко снижена, вместе с тем описан больной в возрасте 61 года.

Синдром частичной трисомии хромосомы 22

Частичная трисомия хромосомы 22 впервые описана в 1978 г. Синдром встречается редко, популяционная частота его не установлена.

Фенотип включает два ведущих признака: первый признак - вертикальная колобома радужки, создающая впечатление «кошачьего глаза». По этой причине известно другое название синдрома - синдром «кошачьего глаза». Второй признак - атрезия ануса.

Эти симптомы обусловлены дупликацией хромосомы 22 в сегменте q11. Кроме колобомы, радужки и атрезии ануса, могут наблюдаться преартикулярные кожные сосочки, ямочки или фистулы, низко расположенные и деформированные ушные раковины, микрофтальмия, эпикант, страбизм, катаракта, антимонголоидный разрез глазных щелей, гипертелоризм, вдавление костей спинки носа; пороки сердца, скелетные и почечные аномалии. Выявляется задержка умственного развития.

Следует заметить, что среди больных с фенотипическими проявлениями данного синдрома выявлены индивиды с нормальным кариотипом, что объясняется наличием эмбрионального мозаицизма, имеющего тенденцию к уменьшению с возрастом, либо трудностями идентификации дублицированного участка хромосомы 22.

Гоносомные синдромы

Гоносомные синдромы делятся на синдромы с мужским и женским фенотипом.

Синдромы с мужским фенотипом

Синдром полисомии по X-хромосоме

Синдромы полисомии по X-хромосоме объединены общим названием - *синдром Клайнфельтера*, который включает следующие цитогенетические варианты:

- кариотип: 47, XXУ - это «классическая форма»; составляет 80% случаев синдрома; частота в популяции - 1:500-700;
- на оставшиеся 20% случаев приходятся кариотипы: 48, XXXУ (встречается крайне редко) и варианты мозаичной формы синдрома: а) 46, XY / 47, XXУ; б) 45, XO / 46, XY / 47, XXУ; в) 46,XY / 46, XX / 47, XXУ.

Фенотип включает триаду признаков: гинекомастия, атрофия или гипоплазия тестикул и бесплодие.

Вследствие гормонального дисбаланса такие больные имеют высокий рост, евнухоидные пропорции (узкие плечи, широкий таз), скудное оволосение. Уровень гонадотропинов в моче соответствует норме или повышен. В эякуляте больных выявляется азооспермия, олигоспермия.

При дифференциальной диагностике синдрома полисомии по X-хромосоме важно учитывать клайнфельтерподобные фенотипы:

- синдром Кальмана (гипогонадизм, аносмия, снижение уровня гонадотропинов в моче); нормальный кариотип: 46, XY;
- синдром Рейфенштейна (гипогонадизм, гинекомастия, гипоспадия, в моче высокий уровень гонадотропинов); нормальный кариотип: 46, XY.

В последние годы к клайнфельтерподобным синдромам стали относить другие варианты:

- синдром 49, XXXXY (частота 1:25 тыс.);
- дисгенитальный нанизм (УО, гипогонадизм) в результате парацентрической микроделеции в сегменте 15q11;

- синдром 46, XX (мужчина с женским кариотипом) - вариант, сопровождающийся той же симптоматикой (гинекомастия, атрофия тестикул, бесплодие).

В последнем случае выделяют три причины:

- транслокация между гомологичными участками X- и Y-хромосом, благодаря которой на X-хромосому переносится ген SRY, обычно локализованный в коротком плече Y-хромосомы;
- нераспознанный мозаицизм - кариотип: 46, XX / 46, XY, установлен на основании цитогенетического исследования клеток одной ткани, например клеток культуры лимфоцитов, тогда как следует исследовать не менее двух-трех разных тканей;
- генная мутация: перенос гена SRY при генной дупликации или его утрата, что ведет к образованию «пустой» Y-хромосомы (без этого гена).

Синдром полисомии по Y-хромосоме

Выделяют следующие цитогенетические варианты данного синдрома: 47, XYY (частота - 1:1000); 48, XXY (1:25 тыс.); 49, XYYYY

(1:25 тыс.).

Фенотип включает признаки синдрома удвоенной Y-хромосомы или «синдрома супермена» (кариотип: 47, XYY). Характеризуется высоким ростом, длинными руками, длинными веретенообразными пальцами, УО.

Во многих случаях у больных отмечается агрессивное или преступное поведение. Степень умственной отсталости увеличивается с числом Y-хромосом.

Синдромы с женским фенотипом

Синдром полисомии по X-хромосоме

Синдром полисомии по X-хромосоме или синдром трипло-X (кариотип: 47, XXX), встречается с частотой 1:770 у новорожденных девочек.

Синдром протекает бессимптомно в раннем детском возрасте и трудно выявляется (в основном при массовом обследовании новорожденных).

Фенотип: в подростковом возрасте у девочек иногда наблюдаются нарушение менструального цикла, умеренная УО. Описаны синдромы полисомии, включающие от 7 до 12 X-хромосом. При этом наблюдается прямая связь числа хромосом с тяжестью клинических проявлений.

Синдром полной моносомии по X-хромосоме

Единственным примером полной моносомии по X-хромосоме является синдром Шерешевского-Тернера. Частота синдрома - 1:1430 новорожденных девочек.

Цитогенетически выделяют 6 вариантов синдрома:

- кариотип: 45, XO; «классический вариант» (55% всех случаев);
- мозаики: 45, XO / 46, XX; 45, XO / 47, XXX; 45, XO / 46, XX / 47, XXX

(10%);

- изохромосома: 45,XO, iso(X) - 20%;
- делеция: 45, XO, del (X) - 5%;
- кольцевая хромосома: 45, XO, r(X) - 5%;
- другие варианты или кариотипы: 46,XY; 46,XO/XY; 46,X0/XYУ.

В последнем случае изменена именно Y-хромосома, в которой в результате мутации утрачен ген SRY.

Фенотип: больные - лица женского пола с задержкой роста и полового развития. У них нормальные наружные и недоразвитые внутренние половые органы (см. главу 23).

Характерный признак - короткая шея с низкой линией роста волос на затылке и крыловидными складками кожи на шее.

В качестве казуистических случаев синдрома выделены:

- синдром с нормальным женским кариотипом 46,XX (вероятно, за счет тканевого мозаицизма, требующего исследования не менее двух-трех тканей);
- синдром с нормальным мужским кариотипом или тернеровский фенотип с нормальным мужским кариотипом (его также называют синдром Нунан). Это моногенная форма есть результат доминантной мутации, приводящей к агенезии гонад.

ГЛАВА 25 ОНКОГЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

Общая характеристика

ОГБ - одна из наиболее проблемных областей теоретической и клинической медицины со времен XIX в. В последние годы эта проблема стала рассматриваться с молекулярно-генетических позиций.

Исторически первое упоминание о возможном наследственном характере семейной формы рака грудной железы относится к 1869 г., когда французский хирург Брока опубликовал результаты исследования родословной своей жены и обнаружил такую опухоль у 10 из 24 женщин - ее близких и дальних родственников.

В настоящее время стало очевидным, что при проведении клинико-генеалогического обследования онкологических больных врачи-генетики почти не встречаются семейных родословных, в которых бы не фиксировались случаи онкологической заболеваемости и смертности у родственников больного пробанда.

Более того, в последние 50-60 лет неуклонно выросла частота многих форм ОГБ, таких, как рак грудной железы, желудочнокишечного тракта, легких, яичников и др. Например, с 1950 г. частота меланомы увеличилась в 20 раз, а с 1980 г. частота ретинобластомы выросла в 3 раза (теперь - 1 случай на 10-15 тыс. человек); частота карциномы почки ежегодно увеличивается на 2%, а нефробластома и нейробластома встречаются с частотой 1:8-10 тыс. человек.

В настоящее время ОГБ встречаются в общей популяции с высокой частотой (детское население - 1:160 человек, взрослое население - 1:10 человек).

Рост частоты ОГБ объясняется не только значительно выросшими в молекулярной медицине возможностями для их диагностики, но и неблагоприятной в ряде случаев экологической обстановкой (см. главу 17). Так, было показано, что после аварии в апреле

1986 г. на Чернобыльской АЭС достоверно выросла частота рака щитовидной железы среди населения, проживающего в районах, подвергшихся радиоактивному заражению.

Окончательное выяснение главенствующей роли генетических и средовых факторов в развитии опухолей у человека произошло на

рубеже XX-XXI вв. благодаря достижениям международной программы «Геном человека» (см. главу 1). Сегодня уже не возникает сомнений, что рак - это полигенное заболевание с наследственной предрасположенностью (90% всех случаев) или моногенное заболевание (10%).

Именно на этой основе ОГБ следует рассматривать как одну из форм наследственной патологии. Какие данные свидетельствуют в пользу такого заключения?

Во-первых, подтверждение в качестве причин ОГБ:

- генных мутаций, как при МБ и ВПР (см. главы 21 и 23);
- хромосомных aberrаций, как при ХБ (см. главу 24);
- суммарного действия генов и факторов среды, как при МФЗ (см. главу 22);
- гиперэкспрессии и эктопической экспрессии генов, как при тератомах (см. ниже).

Во-вторых, в большинстве случаев механизмы канцерогенеза связаны с потерей гетерозиготности протоонкогенов и наличием гомозиготности генов-супрессоров опухолевого роста (см. главу 17).

В-третьих, гетерозиготные носители мутаций протоонкогенов имеют 100% риск развития опухоли, что прямо указывает на генетическую детерминированность опухолевого роста.

В-четвертых, имеет место идентификация в раковой клетке нарушений ее жизненного цикла, не связанных с апоптозом и некрозом. Это позволяет предположить, что происходящие в такой клетке молекулярные преобразования можно рассматривать как ее стремление к ускоренной смерти организма хозяина (см. главу 11).

Современный взгляд на проблемы канцерогенеза

Из главы 17 известно, что этиология и патогенез опухолевого роста связаны с:

- возникновением в протоонкогенах доминантных гетерозиготных мутаций, ведущих к нарушениям экспрессии генов и, как следствие, к образованию патологических белковых продуктов с агрессивной функцией по отношению к нормальным клеткам;
- эффектом генов-супрессоров опухолевого роста, находящихся в гомозиготном состоянии активирующих их мутаций.

Следует отметить, что в первом случае патологические белки проявляют способность к передаче сигналов, индуцирующих нормальные клетки к злокачественному делению при отсутствии внеш-

них регуляторных стимулов со стороны контролирующих систем организма.

По-видимому, такой же способностью обладают так называемые «слитые белки», являющиеся продуктами химерных транскрибируемых генов, образующихся при хромосомных перестройках (см. ниже). В частности, образованию таких белков предшествует слияние по интронным областям двух генов, расположенных в местах разрывов хромосом (см. эффект положения в главе 5). Причем эти два гена могут быть

самые разные, в том числе не связанные с регуляцией роста клетки и дифференцировкой, т.е. «слитые гены» и их белковые продукты приобретают несвойственные им ранее функции по активации новых транскрипционных факторов.

Нарушение экспрессии протоонкогенов обычно связывают с их гиперэкспрессией, но иногда оно обусловлено эктопической экспрессией или работой в местах, не свойственных нормальному расположению (например, в случаях, связанных с тератомами), или находящихся на неподходящей для этого стадии клеточного цикла.

Вместе с тем, гиперэкспрессия клеточных онкогенов (включая протоонкогены) чаще всего является результатом избирательной амплификации. Типичный пример - гиперэкспрессия протоонкогенов, оказавшихся в результате хромосомной перестройки в районах расположения генов Т-клеточных рецепторов или генов иммуноглобулинов и попавших под контроль их мощных промоторов, что приводит к появлению химерных белков с новыми агрессивными функциями и, следовательно, к гиперэкспрессии протоонкогенов.

Как известно, для нормальной клетки характерно физиологическое состояние ритмичного перехода от одного клеточного цикла к другому, обеспечивающее ее пролиферацию, дифференцировку и восстановление поврежденных структур (см. главы 9 и 11). Если обеспечение этого состояния невозможно, клетка переходит к запрограммированной гибели (см. главу 10) либо к неконтролируемому злокачественному росту. При этом внутриклеточные процессы по-прежнему обеспечиваются работой разных групп генов, своевременно включающихся и выключающихся в ходе клеточного цикла.

При переходе клетки к неконтролируемому росту происходит смена каскадов включения-выключения (переключения) групп экспрессирующихся генов, что отражается на общей регуляции клеточного цикла. Очевидно, что важную роль в таком переключении

каскадов играют межклеточные взаимодействия, медиаторами которых служат небольшие молекулы пептидов или факторы роста.

Компоненты пускового механизма опухолевого роста

В любой клетке, находящейся в G_0 стадии жизненного цикла (см. главу 9), можно вызвать процесс деления при воздействии факторов роста на ее трансмембранные рецепторы (см. главу 6). Такое воздействие вызывает в этих рецепторах биохимические сигналы, активирующие или репрессирующие ядерные факторы транскрипции, определяющие наборы генов, работающих в клетке, и ее вхождение в жизненный цикл, т.е. речь идет о пусковой роли факторов роста и трансмембранных рецепторов.

Для запуска опухолевого роста в нормальных клетках, по-видимому, существуют некие узловые точки их жизненного цикла, при прохождении которых требуется определенное соотношение позитивных и негативных регуляторов клеточного роста. Преобладание негативных регуляторов нарушает переход нормальной клетки к следующей стадии жизненного цикла, и такая клетка либо вступает в апоптоз, либо начинает бесконтрольно делиться.

Возникает вопрос: «Что же происходит за пределами нормального клеточного цикла?»

Ответ на этот вопрос, по-видимому, следует искать в организации и функционировании сигнальных молекул, регулирующих клеточный цикл (см. главы 8 и 17). Как известно, передача биохимического сигнала осуществляется путем реакций фосфорилирования и

связана с участием в них регуляторных белков и белков - вторичных мессенджеров, обладающих киназной активностью.

В последние годы для многих генов человека, кодирующих факторы роста, были обнаружены гомологи среди вирусных онкогенов и тем самым было показано, что факторы роста могут действовать как самостоятельные клеточные онкогены - это первый компонент пускового механизма опухолевого роста. Например, к таким онкогенам относится ген PDGE или ген тромбоцитарного фактора роста, у которого бета-цепь гомологична белку, кодируемому геном v-sis вируса саркомы обезьян. Причем в опухолевых тканях находят не мутантные формы гена этого фактора роста, а наблюдают амплификацию, гиперэкспрессию или нарушение тканеспецифической экспрессии.

К другим примерам можно отнести опухолевые ткани при раке желудка и грудной железы: наблюдается гиперэкспрессия генов

INT2 и NST, относящихся к семейству факторов роста фибробластов.

Второй компонент пускового механизма опухолевого роста - это

трансмембранные рецепторы факторов роста (ТРФР), с помощью которых осуществляется перевод внешнего (внеклеточного) сигнала во внутриклеточный сигнал роста. ТРФР состоят из трех доменов: внешний лигандсвязывающий, трансмембранный и внутренний (цитоплазматический) тирозинкиназный; все они обладают аутофосфорилирующей способностью, возникающей при димеризации молекулы рецептора в процессе его взаимодействия с лигандом.

Показана роль многих генов рецепторных киназ как протоонкогенов в случае возникновения доминантных мутаций, вызывающих постоянную активацию рецептора при отсутствии лиганда. Например, детально изучен онкогенный механизм действия мутаций в гене EGFR рецептора эпидермального фактора роста, цитоплазматический домен которого имеет 95% гомологию с онкогеном v-erb вируса эритробластоэза у птиц.

Дополнительными свидетельствами в пользу такого пускового механизма онкогенного действия мутаций являются:

- миссенс-мутации гена NEU и мутации генов нерецепторных тирозинкиназ (семейство src-белков - продукт вируса саркомы Рауса, для которой характерно наличие двух некаталитических последовательностей SH₂ и SH₃);
- мутации гена ABL (гомологичен онкогену v-abl вируса мышинной лейкемии Абельсона);
- мутации генов RAF и MOS серин-треонинкиназ, участвующих в формировании многих типов опухолей (как вторичные мессенджеры);
- мутации в генах гуанин-нуклеотидсвязывающих белков или G-белков.

В этих случаях были выделены две группы производимых мутантных белков: большие белки-гетеродимеры (с эндогенной ГТФазной активностью) и малые белки-мономеры.

Мутации больших G-белков обнаружены при ряде опухолей слизистых оболочек человека, что связано с увеличением продукции циклического АМФ или основного митогенного фактора в тканях слизистых оболочек, секретирующих факторы роста.

В свою очередь, малые G-белки являются важными регуляторами митогенной активности. Среди них хорошо изучено семейство gas- белков (см. главу 8).

Двухударная модель канцерогенеза

Двухударная модель (теория) канцерогенеза была предложена в конце XX в. (Knudson A.G., 1986). Приводился пример гена RB1, описанного как первый ген-супрессор опухолевого роста. Согласно рассматриваемой модели, для перехода нормальной клетки в опухолевую необходимы два последовательных события (удара), или две мутации (рис. 70). Первая мутация (первый удар) - это мутантный аллель гена RB1, приводящий к образованию клетки с повышенным риском злокачественной трансформации или к развитию доброкачественной ретиномы сетчатки. Далее для образования спорадической злокачественной ретинобластомы необходимо появление в этой клетке второй мутации (второй удар), которая возникает в доброкачественной ретинOME сетчатки в 90% случаев.

При этом первая мутация может быть унаследована от одного из родителей или появиться во втором аллеле гена RB1, что приведет к злокачественной ретинобластоме.

В последующие годы двухударная модель развития ретинобластомы была подтверждена наличием гомозиготности по полиморфным

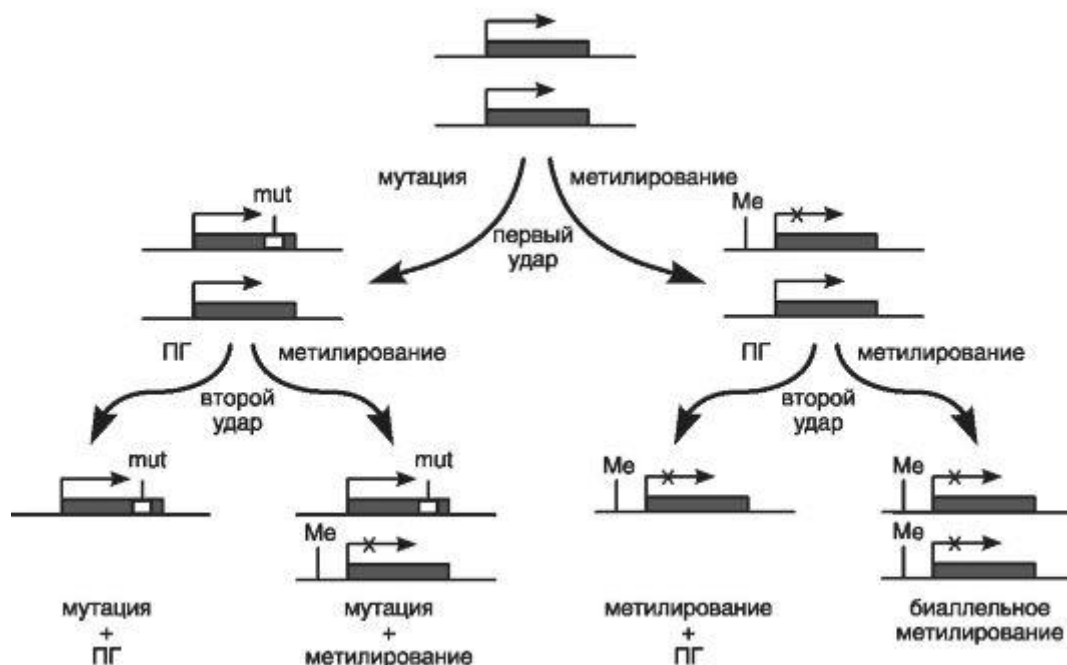


Рис.

70. Двухударная модель канцерогенеза (по Залетаеву Д.В. и соавт., 2005); ПГ - потеря гетерозиготности; Me - метилирование; mut - мутация

ДНК-маркерам, хотя в клетках крови таких больных сохранялась гетерозиготность по этим маркерам. Тем самым было отмечено состояние, связанное с потерей нормальной копии гена.

Следовательно, вторым важным событием стали мутация в неповрежденном аллеле гена и превращение гиперпластической клетки с повышенным риском злокачественной трансформации в раковую клетку, которая начала безостановочно делиться, вызывая рост опухоли.

Было также показано, что второй мутацией может быть не только независимое событие во втором аллеле гена RB1, но и полная потеря локуса хромосомы, содержащего данный ген, или потеря гетерозиготности.

Таким образом, согласно двухударной модели канцерогенеза, основными генетическими механизмами опухолевого роста служат:

- первая мутация в виде структурного нарушения гена-супрессора опухолевого роста, вызывающая гиперпластический, но еще не злокачественный процесс;
- последующая потеря неизмененного аллеля гена в клетках опухоли (потеря гетерозиготности), что служит маркером злокачественного роста.

Именно так считалось до недавнего времени. Однако при анализе экспрессии генов, обуславливающих злокачественный рост, было показано отсутствие экспрессии одних и наличие гиперэкспрессии других генов, поэтому механизмы происходящих в таких клетках изменений оставались невыясненными.

В дальнейшем обнаружено: наиболее важным событием опухолевого роста является аномальное метилирование CpG-островков (динуклеотидов), находящихся как в промоторных, так и внутригенных областях генов-супрессоров.

Оказалось, что метилирование CpG-островков и последующая инактивация генов-супрессоров могут возникнуть не только как результат первой и второй мутаций, но и как результат функциональной мутации (см. ниже), например делеции гена RB1. В связи с этими фактами стала очевидной необходимость определения и анализа профиля метилирования как известных, так и клонированных генов, являющихся кандидатами в гены опухолевого роста.

Как было сказано выше, одной из функций таких генов является их участие в регуляции клеточного цикла в опухолевой клетке.

Окончательным подтверждением такого участия стала идентификация целого ряда генов, вовлеченных в канцерогенез. В частности, выяснилось: большое значение имеет метилирование регуляторных (промоторных) областей, приводящее к инактивации генов-супрессоров в клетках опухоли.

Было также продемонстрировано, что не только генетические причины и механизмы могут определять развитие опухолевого роста - такого рода факторами могут стать эпигенетические (надгеномные) события, касающиеся и наследственных, и ненаследственных изменений экспрессии генов без вмешательства в них структурных нарушений нуклеотидных последовательностей ДНК.

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов в клетках опухоли

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов играет важную роль в опухолевом росте. Она базируется в том числе на аномальном метилировании CpG-островков (находятся в промоторных областях генов), приводящем к полной инактивации генов (см. выше). В геноме человека выделены два типа CpG-динуклеотидов: первый тип - это рассеянные по всему геному отдельные динуклеотиды (их 80%), они расположены в межгенных последовательностях (спейсерах) и редко - в транскрибируемых последовательностях ДНК; второй тип - это островки CpG-динуклеотидов или районы ДНК, обогащенные ими; они расположены вблизи 60% структурных генов, локализованных преимущественно в 5'-районах, где содержатся регуляторные последовательности промоторов. Размеры CpG-островков занимают от 0,5 до 1,5 тыс. н.п.; содержание в них ГЦ-пар превышает 60%, а соотношение CpG/GpC составляет не менее 0,6. За исключением импринтированных генов (см. главу 4), CpG-островки промоторных районов генов нормальных тканей не метилированы.

Тканеспецифические гены не имеют в своих промоторах таких островков, и поэтому в них обнаруживаются только единичные CpG- динуклеотиды, степень метилирования которых различна в разных клетках и тканях, что препятствует локальному связыванию факторов транскрипции.

Метилирование последовательностей ДНК

Метилирование последовательностей ДНК, ее обратимая ковалентная модификация касается только одного из четырех азотистых

оснований - цитозина. Метилирование сопровождается деметилированием. В ходе реакции метилирования-деметилирования образовавшийся в CpG-динуклеотиде цитозиновый остаток метилируется с помощью ДНК-метилтрансфераз, переносящих метильную группу S-аденозилметионина в позиции N₅ пиримидинового кольца (служит мишенью для метилирования). Остатки S-аденозилметионина удаляются с помощью ДНК-деметилазы или гликозилазы.

Этот фермент деметирует геном опухолевых клеток. Он способен узнавать метилированные CpG-динуклеотиды, трансформировать 5-метилцитозин в цитозин и тем самым деметилировать нуклеотидные последовательности ДНК на значительном участке, нарушая стабильность молекулы (рис. 71).

Таким образом, обнаружение связи между снижением активности гена (его выключением) и метилированием промоторной области

5-метилцитозин

NH₂

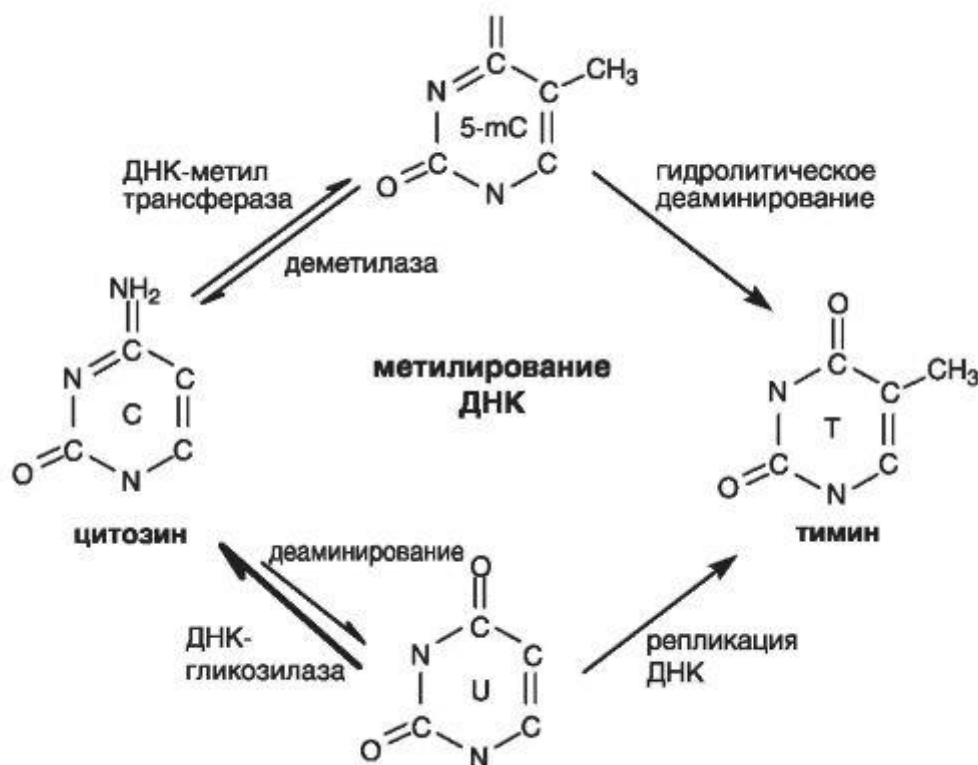


Рис. 71. Схема метилирования-деметилирования (по Залетаеву Д.В. и соавт., 2005)

гена является наиболее веским подтверждением эпигенетического механизма регуляции генной экспрессии.

Кроме того, метилирование последовательностей ДНК включает в себя другие механизмы, способствующие полному прекращению экспрессии гена. Например, метильные группы, выступая в большую бороздку молекулы ДНК, нарушают механизм взаимодействия в реакциях ДНК-белок, препятствуя связыванию специфических транскрипционных факторов. В свою очередь, метилированные районы ДНК могут связывать белки, служащие репрессорами транскрипции, что опосредованно модифицирует состояние хроматина.

Например, процесс деацетилирования гистонов (идет параллельно процессу метилирования) обуславливает более плотную упаковку нуклеосом (см. главу 2), чем вызывает полную инактивацию гена без нарушений его структуры.

Значение метилирования генов, вовлеченных в канцерогенез

Как сказано выше, реакции метилирования с последующей инактивацией клеточных онкогенов могут выступить не только в роли первой или второй мутации (механизм двойного удара), но и функциональной мутации (см. выше). Показана именно такая роль метилирования для многих генов (табл. 14).

Таблица 14. Механизмы инактивации и двойного удара с помощью метилирования одного или двух аллелей генов в опухолевой клетке

Механизм инактивации				Механизм двойного удара				
ген (опухоль)	ПГ*	мута- ции	мети- лиро- вание	гомо- зигот- ная деле- ция	мута- ция + ПГ	мута- ция + мети- лиро- вание	мети- лиро- вание + ПГ	биал- лель- ное мети- лиро- вание
RB1 (рети- нобластома)	+	+	+	Редко	+	+	+	+
TP53 (раз- ные типы опухоли)	+	+	—	Редко	+	+	—	—
VNL (кар- цинома почек)	+	+	+	Редко	+	+	+	?
CDKN2A (меланома)	+	+	+	+	+	+	+	+
KN2B (лей- козы)	+	—	+	+	?	+	+	+
MLH1 (коло- ректальный рак)	+	+	+	?	+	+	?	+
APC (коло- ректальный рак)	+	+	+	?	+	+	+	?

Примечание. «*» - ПГ (промотор гена); «+» - наличие данных; «-» - отсутствие данных, «?» - разноречивые данные.

В последние годы был идентифицирован ряд вовлеченных в канцерогенез генов-супрессоров, инаktivация которых основана на метилировании их регуляторных областей. Эти гены приведены в табл. 15.

Таблица 15. Гены-супрессоры, CpO-островки которых метилируются при злокачественных опухолях

Ген (локус)	Функция белка	Тип опухоли
RB1 (13q14.1)	Регуляция перехода клеточного цикла из фазы G ₁ в фазу S	Ретинобластома, меланома, нефробластома и др.
VNL (3p25.5)	Супрессия генов, активируемых при гипоксии (VEGF)	Опухоли почек
INK4A/p15 (9p21)	Регуляция сигнального пути: циклин D/p53	Острые лейкозы
INK4A/p16 (9p21)	Регуляция сигнального пути: циклин D/Rb	Рак легких, толстой кишки, лимфомы
CDKN2/p16 (9p21)	Негативная регуляция клеточного цикла путем ингибирования циклинзависимых киназ	Наследственные меланомы, опухоли поджелудочной железы, головы и шеи, мезотелиомы, меланомы и глиобластомы, диспластический невус, атипичные родинки
CDH1 (16q22.1); E-кадгерин	Формирование межклеточных контактов	Рак молочной железы, желудка, печени, мочевого пузыря
APC (5q21)	Формирование межклеточных контактов	Колоректальный рак
BRCA1 (17q21)	Узнавание и репарация повреждений ДНК	Рак молочной железы
MLNH1 (2p22)	Репарация неспаренных участков ДНК	Рак желудка, толстой кишки, эндометрия
ER (6q25.1)	Рецептор эстрогена	Рак молочной железы, груди, толстой кишки, острые лейкозы
HIC1 (17p13.3)	Транскрипционный фактор	Рак молочной железы, легких, почек, толстой кишки
MDG1 (1p35)	Регулятор клеточного цикла	Рак молочной железы
GSTP1 (11q13)	Фермент детоксикации ксенобиотиков	Рак молочной железы, печени, почек, простаты, толстой кишки
MGMT (10q26)	Метилгуанинметилтрансфераза	Рак молочной железы, легких, мозга
CALCA (11p15)	Кальцитонин	Рак легких, толстой кишки
THBS1 (15q15)	Ингибитор ангиогенеза	Острые миелоидные лейкозы

Следует отметить, что анализ метилирования промоторных районов указанных генов-супрессоров

(как и ряда генов МБ) при эпигенетической регуляции их экспрессии оказался в целом намного проще и экономически выгоднее (в сравнении с традиционными молекулярно-генетическими технологиями) для оценки вклада клеточных онкогенов в развитие как нормальных, так и злокачественных клеток. Аномальное метилирование-деметилирование в настоящее время стало современным диагностическим тестом и прогностическим маркером при выявлении определенных типов опухолей.

Характеристика профиля (паттерна) метилирования известных генов человека и вновь клонированных генов в разных тканях и типах опухолей вносит существенный вклад в понимание механизмов опухолевого роста. Именно это направление стало новым направлением молекулярной медицины, которое, как полагают ученые, приведет в ближайшие годы к разработке эффективных диагностических

технологий и методов терапии как разных типов рака, так и МБ (см. главы 4, 7, 17 и 21).

ДНК-диагностика рака

В настоящее время в ДНК-диагностике рака выделено пять направлений. Среди них диагностика наследственных форм рака; маркеров неблагоприятного прогноза рака; маркеров микрометастазов рака (минимальной остаточной болезни); маркеров начальных стадий рака; маркеров, увеличивающих риск определенного типа рака.

Первое направление включает идентификацию мутаций генов-супрессоров опухолевого роста, участвующих в регуляции клеточного цикла. В частности, ведется поиск мутаций одного из аллелей гена RB1, наследуемого по аутосомно-доминантному типу и проявляющегося варьирующей экспрессивностью и неполной пенетрантностью (90%) - это *первый пример*. В данном случае доброкачественная ретинома сетчатки глаза развивается в результате инактивации неповрежденного аллеля гена - это первая мутация (удар), возникающая, как правило, в раннем детском возрасте и гораздо реже - во внутриутробном периоде развития. Вторая мутация (удар) может возникнуть в сетчатке глаза (что вызовет злокачественную ретинобластому) или других соматических клетках (что вызовет вторичную опухоль). При этом в роли вторичной опухоли может выступить основное заболевание (лимфоклеточный лейкоз, рак легких или мелкоклеточный рак, рак грудной железы, рак половых органов и остеосаркома).

Второй пример - это идентификация мутаций при нефробластоме, которая относится к генетически гетерогенным заболеваниям, в том числе в каждом третьем случае она связана с инактивацией гена-супрессора WT1. В ряде случаев нефробластома обусловлена делецией сегмента короткого плеча хромосомы 11 (11p13) и приводит к синдрому WAGR (опухоль Вилмса, аномалии мочеполовой системы и задержка физического и умственного развития). В более редких случаях нефробластома связана с точковыми мутациями гена транскрипционного фактора (миссенс-мутации) или белкового мотива «цинковые пальцы», обуславливающего развитие синдрома Дениса-Дрэша (см. главы 16 и 17), проявляющегося прогрессирующей нефропатией, псевдогермафродитизмом, нефробластомой и гонадобластомой.

Третий пример - это синдром фон Хиппель-Линдау, объединяющий четыре типа опухолей (гемангиобластома, карцинома почки, феохромоцитома и опухоль поджелудочной железы), обусловленных

мутациями гена VHL (3p25.5), к которым относятся: крупные делеции; мутации сдвига рамки считывания; миссенс-мутации экзонов 1 и 3; соматические мутации экзонов 1 и 2 (только в клетках изолированных непапиллярных карцином почки).

При этом 20% опухолей связаны с метилированием промоторной части гена.

Четвертый пример - семейный аденоматозный полипоз желудочно-кишечного тракта и его вариант - аутосомнодоминантный синдром Гарднера с преимущественным поражением толстого кишечника. При этом заболевании часто выявляются гепатобластомы, медуллобластомы, фибромы, рак щитовидной железы, которые обусловлены делециями и нонсенс-мутациями, ведущими к преждевременной остановке синтеза белка в результате повреждения двух кодонов (1061 и 1309). Причем мутации второго кодона вызывают быстрое появление полипов и их злокачественное перерождение, тогда как соматические мутации, как правило, затрагивают кодоны 1286 и 1513.

Пятый пример - синдром Горлина или синдром базальноклеточного невуса, связанный с мутацией в гене-супрессоре RCT1 (9p22.3). Этот синдром - редкое аутосомнодоминантное заболевание, проявляющееся множественными аномалиями развития, невусами и вторичными злокачественными опухолями (астроцитомы, базально-клеточные карциномы, карциномы и фибромы яичников, медуллобластомы). При этих типах опухолей выявляется генетический (геномный) полиморфизм по промоторным областям гена - маркерам сегмента 9p22.3.

Другие примеры мутаций генов наследственных форм рака:

- гена-супрессора p53 или гена синдрома Ли-Фрамени; сопровождается опухолями мозга, саркомами мягких тканей, остеосаркомами, карциномой молочной железы, лейкемией;
- гена атаксии-телеангиэктазии или синдрома Луи-Бар (11q23.1); обуславливает развитие глиомы, В-клеточной лимфомы, медуллобластомы и Т-клеточной лейкемии;
- гена NBS1 или гена синдрома Ниймиген; обуславливает аномалии фенотипа, иммунодефицит, предрасположенность к развитию гемобластом, лимфобластной лейкемии, лимфом и нейробластом; в последнем случае: нейробластома - это одна из частых и хорошо изученных у детей солидных опухолей трех типов, развивающихся по разным генетическим причинам (потеря гетерозиготности 1p или 14q; варьирующая активность теломеразы; разная экспрессия гена TRK-A); генов рака грудной железы (BRCA1 и BRCA2, обуславливают развитие вторичного рака поджелудочной железы или яичников). Второе направление связано с поиском маркеров неблагоприятного прогноза рака.

Известно, что 90% случаев рака связаны с генами наследственной предрасположенности, сочетающейся с действием факторов среды, т.е. с мультифакториальными причинами. Такой рак нередко возникает спорадически, без отягощенного семейного анамнеза, обязательного при наследственных формах рака.

При этом всякий раз в геноме соматической клетки выявляются уникальные индивидуальные изменения, характеризующие процесс злокачественного перерождения и связанные с типом мутации, а также типом экспрессии (инактивация или амплификация) и другими особенностями.

Иными словами, всякий раз необходимо определение индивидуального молекулярного профиля опухолевого роста, что затрудняет определение прогноза и тактики лечения онкологического заболевания.

Следует отметить, что раннее обнаружение прогностических маркеров рака связано с решением ряда вопросов (поиск опухоли, анализ ее инвазивности и способности к метастазированию, восприимчивость или невосприимчивость к терапии, определение периода ремиссии и процента выживаемости больного).

В настоящее время накоплены данные о молекулярной структуре ряда опухолей, установлены характерные для каждой нозологии молекулярные маркеры, позволяющие поставить точный диагноз уже при анализе гистологического препарата.

В свою очередь, прогностически ценно (например, при раке грудной железы) установление факта экспрессии или гиперэкспрессии некоторых генов в клетках опухоли, таких, как гены онкогенов RANM и HER2/neu, кадгерина-11, сиалилтрансфераз ST3Gal III и ST6Gal I, стероидной сульфатазы, циклина CCND1, альфа- и бетаэстрогенных рецепторов, лекарственной резистентности MDr1 и фактора роста гепатоцитов HGF.

Одновременная экспрессия сразу нескольких генов может свидетельствовать об относительно благоприятном прогнозе, например, в случаях совместной экспрессии антиметастатического гена nm 23, гена ICAM-1 и гена простат-специфического антигена (PSA).

О благоприятном прогнозе будет также свидетельствовать потеря гетерозиготности по маркерам хромосомы 16 (16q23.2-q24.2), тогда как потеря гетерозиготности по короткому плечу хромосомы 17 (17p13.3), наоборот, будет указывать на неблагоприятный прогноз.

В свою очередь, при раке простаты прогноз неблагоприятен при гиперэкспрессии гена орнитиндекарбоксилазы, эктопической экспрессии TSPY и отсутствии экспрессии TGF-бета в тестикулах.

При раке легкого на неблагоприятный прогноз будет указывать снижение экспрессии белка-ингибитора клеточного цикла p27 и потеря аллелей гена-супрессора FNIT, тогда как благоприятный прогноз будет связан с экспрессией тромбоспондина TSP2, ингибирующего рост и метастазирование опухоли.

В случае колоректального рака прогноз неблагоприятен при выраженной экспрессии генов таких белков, как катепсин В, CD44, p53 и тимидилатсинтетаза, NRP1 рецептор витамина D, а также при отсутствии экспрессии гена (локализован на длинном плече хромосомы 18), кодирующего белок p21.

При агрессивных карциномах пищевода и желудка будет наблюдаться гиперэкспрессия генов ST3, BM-4-/SPARK, MET, uPA и потеря гетерозиготности по маркерам длинного плеча хромосомы 18.

Кроме того, прогноз в отношении других типов опухолей неблагоприятен при гиперэкспрессии генов: транскрипционного фактора Id2, каспазы-1, тимидинфосфорилазы, промоторов DPC1 на коротком плече хромосомы 1 и DCC1 на длинном плече хромосомы 18 (рак поджелудочной железы); генов опухолю-индуцированного белка-антигена GAGE и делеции длинного плеча хромосомы 10 (генсупрессор PTEN) - соответственно выявляются при глиомах и высокоинвазивных менингиомах; генов циклина А (карцинома печени) и D (саркома мягких тканей конечностей); гена Lerk-5 (агрессивная меланома) и гена кадгерина-6 (карцинома почки).

Третье направление связано с диагностикой минимальной остаточной болезни или поиском метастазов высокоинвазивных опухолей. Оно базируется на определении экспрессии ряда опухолю-специфических генов в образце биологического материала с помощью ПЦР с праймерами на обратно транскрибируемую мРНК или ОТ-мРНК. Такие праймеры получены для агрессивной меланомы (экспрессия тирозиназы; гликопротеина MUC18, участвующего в клеточной адгезии, и бета1-4-N-ацетил-галактозаминилтрансферазы); метастазирующей нейробластомы (экспрессия тирозингидроксилазы); рака грудной

железы (экспрессия маммоглобин-тканеспецифического маркера, цитокератина 19 или гена СК19, рецептора эпидермального фактора роста или гена EGFR); рака желудка (экспрессия гена СК19 и карциноэмбрионального антигена СЕА); рака эпителия желудочнокишечного тракта (экспрессия цитокератина 20); рака поджелудочной железы или легких (экспрессия гена СК19); рака простаты (экспрессия гена PSA); саркомы Юинга и рабдомиосаркомы.

Четвертое направление позволяет определить заболевание на ранних стадиях опухолевого процесса, т.е. это проспективная диагностика, проводимая при диспансеризации населения в группах лиц повышенного риска определенной онкопатологии. Такая диагностика предусматривает мониторинг молекулярных маркеров задолго до манифестации роста опухоли.

Методы диагностики этого направления основаны на исследованиях ДНК, выделенной из плазмы и клеток крови, желудочного сока, мокроты, слюны, мазков из половых путей, а также мочи и кала.

Особое место среди этих методов занимает высокоточная диагностика с помощью стандартных наборов ДНК-маркеров по клеткам и плазме крови, в которых определяют: аномальное метилирование генов RB1, p15 и p16 (гепатоклеточная карцинома, лейкозы и лимфомы), генов MLH1 и CDH1; микросателлитную нестабильность и потерю гетерозиготности в определенных районах хромосом; мутации генов p53 и K-ras.

Например, аномальное метилирование гена p16 определяется в гиперплазированных клетках бронхолегочного эпителия при раке легких (в мокроте) и для идентификации вирусов папилломы XVI и XVIII типов при ранних стадиях рака шейки матки.

Наличие вируса папилломы указывает на рак пищевода.

Аномальное метилирование гена MLH1 свидетельствует о начальных стадиях рака желудка и аденоме толстого кишечника (определяется в смыве ректального содержимого), а функциональная инактивация генов APC, CDKN2A указывает на рак желудка.

Пятое направление связано с поиском полиморфизмов ДНК, вовлеченных в канцерогенез и обуславливающих усиление или ослабление экспрессии генов. Такие полиморфизмы могут быть локализованы как в кодирующих, так и в некодирующих районах генов и наиболее часто идентифицируются у пациентов групп высокого риска - лиц с моногенными и онкологическими заболеваниями, не восприимчивых к терапии некоторыми лекарственными препаратами.

В этом направлении диагностики важное значение имеют полиморфизмы цитохрома P₄₅₀ (см. главу 11), среди которых аллели нуклеотидного повтора ТТТА₇ в интроне 4 гена CYP19, которые идентифицированы у больных раком грудной железы и гомозигот по этому аллелю, имеющих родственников, болеющих раком легких, толстого кишечника, яичников и др. В то же время другой аллель ТТТА₁₂ в 5 раз чаще выявляется у здоровых лиц, чем у больных.

Кроме того, один из полиморфизмов по третьему экзону гена CYP19 (замена гуанина на аденин в кодоне 80, контролирующем валин) обнаружен у больных с аллелем ТТТА₇, что связано с увеличением активности цитохрома P₄₅₀ и нечувствительностью к действию его ингибитора 4-гидроксиандростендиона.

Повышенный риск развития рака грудной железы может быть связан с другим цитохромом: P₄₅₀c17альфа (ген CYP17), участвующим в синтезе стероидных гормонов. В этом случае в позиции 27 в области 5'-конца гена выявлена замена тимина на цитозин,

создающая сайт узнавания для фермента MspAI и транскрипционного фактора Sp1, который в 2,5 раза увеличивает экспрессию гена CYP17 и риск развития рака грудной железы. У таких больных также идентифицирована миссенс-мутация в гене MnSOD (замена тимина на цитозин), приводящая к замене валина на аланин и редко встречающаяся у здоровых женщин. Показано также, что у женщин репродуктивного возраста, являющихся гомозиготами по аланину (A/A), риск развития рака грудной железы в четыре раза выше, чем у женщин с одним или двумя аллелями по валину.

В настоящее время доказана роль гена андрогенового рецептора (AR) в развитии рака простаты, что связано со снижением его транскрипционной активности и увеличением числа тринуклеотидных повторов (CAO)п. Причем укороченные по длине повторы (меньше 18 триплетов) чаще ассоциированы с раком простаты, чем повторы, содержащие 26 триплетов и более.

Кроме того, показана роль других генетических полиморфизмов, обуславливающих развитие разных типов рака. Так, например, замена тимина на цитозин в позиции 264 ниже участка полиаденилирования в гене CYP1A1 в 2,4 раза увеличивает риск развития сквамозной карциномы; замена аргинина на пролин (в результате замены гуанина на цитозин) в кодоне 72 гена p53 увеличивает риск развития рака легких у жителей острова Тайвань; замена изолейцина на валин в кодоне 104 гена GSTP1 ведет к увеличению риска рака

грудной железы, пищевода и тестикул; аллельный полиморфизм протоонкогена Hras1 свидетельствует о неблагоприятном течении рака легкого; аллель A4 намного чаще выявляется при агрессивном низкодифференцированном немелкоклеточном раке легкого.

В процесс канцерогенеза вовлечен ген PADPRP, принимающий участие в репарации, репликации и рекомбинации ДНК, а также его процессированный псевдоген, локализованный на хромосоме 13 (13q33), имеющий биаллельный полиморфизм по бета-аллелю (делеция 193 н.п.), а гомозиготный вариант по этому бета-аллелю повышает в 2,4 раза риск развития аденокарциномы у курильщиков и т.д.

Молекулярные механизмы опухолевого ангиогенеза

Данные о более интенсивной по сравнению с нормой васкуляризации опухолевой ткани накапливаются в онкологии более 100 лет. В 1971 г. И. Фолкман впервые предложил гипотезу зависимости опухолевого роста от ангиогенеза. Согласно этой гипотезе, эндотелиальные и опухолевые клетки, находящиеся внутри опухоли, формируют единую экосистему, в которой покоящиеся клетки эндотелия переводятся в фазу быстрого роста с помощью химических сигналов, исходящих от опухолевых клеток.

Но только в конце 80-х годов XX в. были получены экспериментальные и клинические доказательства зависимости процесса метастазирования от ангиогенеза. Чтобы опухоль метастазировала, опухолевые клетки должны получить доступ к сосудам первичной опухоли, выжить в кровотоке, выйти из микрососудов в микрососуды органа-мишени, закрепиться и пролиферировать в них, индуцировать ангиогенез. Только потом они приобретают способность отвечать на митогенный сигнал ростовых факторов. При этом количество опухолевых клеток, попавших в кровяное русло через пролиферирующие капилляры (они характеризуются текучестью из-за фрагментарности базальной мембраны), коррелирует с плотностью сосудов опухоли, а также количеством легочных метастазов, наблюдаемых позднее.

Далее опухоль секретирует ангиогенные факторы bFGF и VPF/ VEGF, индуцирует пролиферирующими эндотелиальными клетками секрецию активаторов плазминогена и

эластазы, что вносит дополнительный вклад в деградацию базальной мембраны сосуда и способствует проникновению опухолевых клеток в кровяное русло.

В случае, когда метастазы лишены ангиогенной активности, они могут неопределенно долго сохраняться в виде микроскопических

опухолей в «спящем» состоянии, которому соответствует баланс пролиферации и апоптоза опухолевых клеток.

Иными словами, плотность кровеносных сосудов во многих типах опухолей является прогностическим фактором риска метастазирования.

Последовательность событий, приводящих к васкуляризации опухолей, служит отражением событий физиологического ангиогенеза (см. главу 12). Среди последних: активация эндотелиальных клеток около сосудов опухоли, индукция протеолитической активности (обуславливает деградацию базальной мембраны сосудапредшественника и прилежащего внеклеточного матрикса), миграция и пролиферация клеток эндотелия, формирование капиллярных структур и организация кровяного потока.

Вместе с тем, опухолевый ангиогенез имеет ряд особенностей:

а) в зону около опухоли привлекаются клетки, участвующие в воспалении (лимфоциты, макрофаги, тромбоциты, тучные клетки и др.); они усиливают ангиогенный сигнал, продуцируя ряд цитокинов, обладающих способностью к митогенной стимуляции эндотелия: интерлейкины 1, 2 и 8, TNF-альфа и др.;

б) имеет место повышенная экспрессия на клеточной поверхности тирозинкиназных рецепторов (Flk1, Flt1, Tie1, Tie2, ERB2/her и др.); они обеспечивают проведение митогенных сигналов от ангиогенных факторов (VEGF, ангиопоэтины 1 и 2, EOF и др.); при этом клетки эндотелия теряют чувствительность к антипролиферативным сигналам перититов, интегрированных в базальную мембрану эндотелия сосудов и в норме секретирующих мощный ингибитор ангиогенеза - TOF-бета;

в) имеет место повышенная проницаемость сосудов, питающих опухоль; причина - высокая экспрессия вазодилататора - оксида азота на фоне гиперэкспрессии VEOF; действуя совместно, эти два фактора образуют широкие промежутки между клетками эндотелия, заполненные микротромбами, и базальная мембрана имеет обширные разрывы;

г) имеют место плазморрагии, гиалиноз стенок и внутривеночные кровоизлияния в предшествующих кровеносных сосудах, инфильтрирующих опухолевую ткань;

д) имеет место дальнейшая дополнительная дестабилизация кровеносных сосудов за счет дезинтеграции их базальной мембраны на основе действия протеиназ (гепариназа, плазмин, урокиназа и др.).

Особенно васкулиризованными опухолями являются: гемангиобластома, глиома, легочная карцинома, меланома и фибросаркома.

В таблице 16 представлены основные регуляторные ангиогенные факторы опухолевого ангиогенеза.

Таблица 16. Основные ангиогенные факторы, участвующие в регуляции опухолевого ангиогенеза (по Луценко С.В. и соавт., 2004)

Ангиогенный фактор	Молеку- лярная масса, кДа	Механизм действия	Источники факторов
Фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF/VPR)	40–45	Стимуляция миграции, про- лиферации и дифференцировки клеток эндотелия, повышение проницаемости сосудов	Опухолевые и эндоте- лиальные клетки, макрофаги
Фактор роста фибробластов (bFGF)	18	Стимуляция миграции и про- лиферации клеток эндотелия, индукция экспрессии урокина- зы и ее рецепторов эндотелиаль- ными клетками, участие в фор- мировании капиллярных трубок	Опухолевые и эндоте- лиальные клетки, макрофаги, фибробла- сты
Трансфор- мирующий фактор роста- альфа (TGF- альфа)	5,5	Индукция миграции и пролифе- рации эндотелиальных клеток, формирование капиллярных структур <i>in vitro</i>	Опухолевые и эндоте- лиальные клетки, макрофаги
Трансфор- мирующий фактор роста- бета (TGF- бета)	25	Ингибция пролиферации эндотелия <i>in vitro</i> ; стимуляция миграции и пролиферации кле- ток эндотелия <i>in vivo</i> ; мощный хемоаттрактант для моноцитов и макрофагов	Эндотели- альные клетки, макрофаги, Т-лимфо- циты
ФНО (TNF- альфа)	17	Ингибция пролиферации эндо- телиа <i>in vitro</i> ; индукция экс- прессии и секреции урокиназы эндотелием; стимуляция диф- ференцировки эндотелиальных клеток, формирование капил- лярных трубок <i>in vivo</i>	Опухолевые клетки, макрофаги

Тромбоцитарный фактор роста эндотелия (PD-TCGF)	45	Стимуляция миграции и хемотаксиса эндотелиальных клеток	Макрофаги, тромбоциты
Колоние-стимулирующий фактор (GM-CSF)	17	Стимуляция пролиферации и миграции эндотелия; хемотрактант для мононуклеарных клеток	Мононуклеарные и эндотелиальные клетки, Т-лимфоциты
Плацентарный фактор роста (PLGF)	25	Индукция пролиферации, миграции и дифференцировки эндотелия	Опухолевые и эндотелиальные клетки
Интерлейкин-8 (IL-8)	40	Индукция пролиферации эндотелия; хемотрактант для мононуклеарных клеток	Мононуклеарные и эндотелиальные клетки, нейтрофилы
Ангиопэтин 1 (Ang-1)	70	Стабилизация кровеносных капилляров; медиатор перипи-тоэндотелиальных взаимодействий в стенке сосуда	Опухолевые и эндотелиальные клетки
Ангиопэтин 2 (Ang-2)	66	Совместно с VEGF стимулирует ангиогенез путем участия в дестабилизации предсуществующих кровеносных сосудов	Опухолевые и эндотелиальные клетки

Как следует

из данных этой таблицы, одним из основных факторов, экспрессируемых большинством васкуляризованных опухолей, является VEGF с широким спектром действия (стимуляция пролиферации, миграции и дифференцировки клеток эндотелия; регуляция их активности совместно с неспецифическими факторами роста - bFGF, TGF-бета, PDGF). Этот фактор является не только наиболее важным прогностическим показателем интенсивности васкуляризации опухолей, но и одним из первых факторов, для борьбы с которым стала разрабатываться антиангиогенная терапия.

Проангиогенные болезни, подходы к их терапии и терапии рака

К проангиогенным болезням относятся: ангиофиброма, артрит, атеросклероз, гемангиома, гемофилическая артропатия, глаукома, гранулема, диабетическая ретинопатия, несросшийся перелом, псориаз, ретроленталевая фибропатия, синдромы Ослера-Вебера и Хиппеля-Линдау, склеродермия, солидные опухоли, трахома и некоторые другие.

В настоящее время разработан целый ряд антиангиогенных препаратов для лечения проангиогенных заболеваний. Такая терапия строится на основе ингибирования регуляторного сигнала, поступающего после формирования лигандрецепторного комплекса и связанного с блокированием процесса фосфорилирования внутриклеточного домена рецепторов тирозина, что полностью тормозит митогенное действие антиангиогенных факторов роста.

К некоторым из таких препаратов относятся: ангиозимы, каталитически активные нуклеиновые кислоты, блокирующие секрецию рецептора VEGF на стадии мРНК;

антисмысловые олигонуклеотидные последовательности комплементарных мРНК, блокирующие экспрессию bFGF, VEGF и других факторов роста и их рецепторов; химиопрепараты, воздействующие на разные этапы каскада реакций внутриклеточной передачи регуляторного сигнала от фактора роста и др.

ГЛАВА 26 ПЕРОКСИСОМЫ И МИТОХОНДРИИ И ИХ БОЛЕЗНИ

Происхождение и наследование пероксисом и митохондрий

При образовании зиготы в ней объединяются все структурнофункциональные элементы ядра и цитоплазмы яйцеклетки и элементы ядра (головки) сперматозоида; шейка и хвост мужской гаметы в цитоплазму женской гаметы не проникают (см. главы 4, 6 и 12). На этой основе (два ядра и одна цитоплазма) начинается онтогенез многоклеточного организма, в ходе которого сначала идут стадии деления-дробления зиготы, затем последующего митоза соматических клеток, а во внутриутробном онтогенезе появляются еще и мейотические деления, которые затем останавливаются. Остановка мейоза продолжается до постнатального этапа половой зрелости организма, когда начинают формироваться функционально зрелые женские или мужские гаметы.

В свою очередь, митотические деления клеток продолжают до завершающего этапа онтогенеза.

Говоря о материнском происхождении пероксисом и митохондрий, следует отметить, что они (так же, как аппарат Гольджи, лизосомы и ЭР) происходят из женской гаметы, которая после оплодотворения мужской гаметой становится зиготой, и далее ее структурнофункциональные элементы передаются каждой соматической клетке в ходе развития многоклеточного организма.

Передача цитоплазмы из клетки в клетку идет в три этапа:

- первый этап (митоз) - цитоплазма исходно делящейся соматической клетки поступает только в одну из двух образующихся дочерних клеток;
- второй этап (мейоз) - дочерняя клетка, получившая всю цитоплазму материнской клетки, в свою очередь делится на две дочерние клетки, в одну из которых передается вся цитоплазма; вторая дочерняя клетка цитоплазму не получает;
- третий этап - одна из четырех дочерних клеток, получившая цитоплазму, становится функционально активной, способной к

оплодотворению яйцеклеткой; три другие дочерние клетки цитоплазму не получают - это полярные тельца.

Иными словами, передача цитоплазмы (и ее структур) от исходной соматической клетки идет исключительно через женские гаметы по линии мать-дочь. Это материнское наследование.

Однако полное материнское наследование возможно только в случае, если в зиготу не попадут даже единичные отцовские митохондрии или их деление будет заблокировано. Данный факт имеет принципиальное значение для понимания механизмов формирования полиморфизма мтДНК, ибо при отсутствии митохондрий отцовского происхождения невозможен кроссинговер между родительскими гомологами мтДНК и образование новых комбинаций митохондриальных генов, т.е. мтДНК - всегда материнского происхождения. Как показали результаты выполнения международной программы «Геном человека», мтДНК, выделенная из костей черепа современного человека, по нуклеотидному составу

соответствует мтДНК, выделенной из костей черепа ископаемого человека, проживавшего на севере африканского континента предположительно 150-200 тыс. лет тому назад. Данный факт был положен в основу гипотезы Г. Уилсона (1987) о происхождении вида: *Homo sapiens* (Человек разумный) произошел от этого ископаемого первобытного человека.

Вместе с тем, данной гипотезой воспользовались современные креационисты, посчитавшие, что на ее основе базируется теория божественного сотворения мира, согласно которой человек произошел от общих прародителей - Евы и Адама, живших в Библейском Раю (междуречье между Тигром и Ефратом), и именно этот географический район Земли оказался поблизости от севера африканского континента, где была обнаружена мтДНК, извлеченная из ископаемых останков первобытного человека (см. главу 1).

Однако вернемся к материнскому происхождению мтДНК. Как пример, следует привести наследственную атрофию Лебера, которая в одних случаях обусловлена дефектами самой мтДНК, а в других случаях - дефектами ядерной ДНК, т.е. болезнь передается из поколения в поколение либо по нетрадиционному варианту (материнское наследование), либо по традиционному варианту (моногенное наследование) соответственно. Во втором случае характерны два типа наследования: аутосомно-доминантный и аутосомно-рецессивный (см. главу 4).

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРОКСИСОМ И ПЕРОКСИСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Пероксисомы

Пероксисомы представляют собой круглые или овальные органеллы, находящиеся во всех клетках организма (кроме зрелых эритроцитов); их диаметр 0,2-1,0 микрон. Они имеют матрикс, окруженный одинарной мембраной.

Количество, размеры и форма пероксисом варьируют в разных тканях: больше всего пероксисом в клетках печени и почек, меньше (и меньшего размера) - в клетках кожи и мозга.

В пероксисомах нет своей ДНК (как в митохондриях), и поэтому они не производят, а «импортируют» составляющие их белки - пероксины, вовлеченные в биогенез органелл. Изучены функции 20 пероксинов, в том числе локализованы гены 9 белков.

Белки матрикса и мембраны пероксисом синтезируются на свободных полисомах в цитозоле и транспортируются пероксисомами, в которых содержатся многочисленные ферменты (не менее 50), представленные в основном оксидазами, использующими кислород для окисления разных субстратов клетки. При этом продуктом восстановления кислорода служит не вода, а перекись водорода, которая окисляет субстраты, например алкоголь. Пероксисомам приписываются анаболическая и катаболическая функции. Их работа (наряду с процессами окисления) направлена на защиту клетки с помощью каталаз от образующегося в ней (в основном в митохондриях) атомарного кислорода (см. главу 11).

Ферменты пероксисом также участвуют в биосинтезе эстерифицированных фосфолипидов, окислении глютаровой, L-пипеколиновой и фитановой кислот, D-аминокислот и некоторых фенолов, бетаокислении части длинноцепочечных и всех ОДЦЖК, которые не могут быть окислены в митохондриях (до укорочения длинных цепей), и метаболизме простагландинов и холестерина (см. главы 6 и 7). Кроме того, имеются все основания считать, что пероксисомы причастны к переработке холестерина в

желчные кислоты (например, клофибрат, снижающий его уровень в крови, вызывает значительное увеличение числа пероксисом в печени).

Специфичность функционирования пероксисом проявляется в том, что в них:

- не окисляются короткие, среднецепочечные и большая часть длинноцепочечных жирных кислот - это функция митохондрий (см. ниже);
- ацил-КоА оксидаза пероксисом переносит электроны непосредственно на кислород, тогда как в митохондриях ацил-КоА дегидрогеназа переводит ацил-КоА в эноил-КоА, и электроны переносятся на ФАД+;
- ферменты пероксисом и митохондрий кодируются разными генами.

В пероксисомах протекают начальные этапы биосинтеза плазмалогенов (глицеролипидов), содержащих ненасыщенный спирт, соединенный простой эфирной связью с глицерином фосфолипида. Плазмалогены входят в состав 5-20% фосфолипидов клеточных мембран и формируют структуру миелина. Они непосредственно участвуют в активации тромбоцитов, удалении свободных радикалов, переработке холестерина в желчные кислоты и других реакциях (см. главы 6 и 13).

Нарушения биогенеза пероксисом сопровождается снижением их количества или полным отсутствием в клетках разных тканей организма, что связано с развитием пероксисомных болезней.

Пероксисомные болезни Общие данные

Пероксисомные болезни (ПерБ) обусловлены нарушениями структуры и функционирования пероксисом, т.е. связаны со сложными метаболическими реакциями, в том числе нарушениями транспорта белков через мембраны пероксисом и с работой мембранных рецепторов.

Популяционная частота ПерБ составляет 1:25-50 тыс.

Известно не менее 17 нозологий. Большинство из них наследуются по аутосомно-рецессивному типу (кроме X-сцепленной адренолейкодистрофии), и практически все они проявляются в раннем детском возрасте (кроме гипероксалурии I типа и X-сцепленной адренолейкодистрофии). Примерами наиболее распространенных форм ПерБ служат: адренолейкодистрофия, ризомиелическая точечная хондродистрофия, синдромы Рефсума и Цельвегера. Для этих заболеваний характерны генетическая гетерогенность и клинический полиморфизм. В частности, продемонстрировано развитие нескольких симптомокомплексов при мутациях в одном и том же гене и развитие одного симптомокомплекса при мутациях в разных генах. Причем

в первом случае различия обеспечивались аллельными сериями одного и того же гена или его плейотропным действием, а во втором случае - мутациями в разных генах (аллелях) и генокопированием сходной клинической картины (см. главу 4). Например, при ризомиелической точечной хондродисплазии выделены мутации в двух разных генах, хотя наблюдается один и тот же фенотип.

Широко известна морфофункциональная классификация ПерБ, основанная на двух критериях: количество пероксисом в клетках печени (морфологический критерий) и степень нарушения функций пероксисом (физиологический критерий). В соответствии с этой классификацией выделяют три группы ПерБ: *первая группа* отличается значительным снижением количества пероксисом в клетках печени и нарушением в них всех биохимических процессов; *вторая группа* характеризуется нормальным количеством

пероксисом в клетках печени и нарушением в них только некоторых биохимических процессов; *третья группа* сопровождается полным подавлением функции пероксисом при нормальном их количестве в клетках печени.

В последние годы произошло уточнение этой классификации, и теперь среди всех ПерБ выделяют два основных класса. Первый класс болезней - это комплексные дефекты или генерализованное нарушение функций (пероксисомы отсутствуют или их число резко снижено). Примеры: болезнь Рефсума новорожденных, неонатальная адренолейкодистрофия, ризомиелическая точечная хондродисплазия, цереброгепаторенальный синдром Цельвегера и цельвегероподобный синдром. Второй класс болезней - это болезни, при которых структура пероксисом сохранена, но имеется мутация в гене, контролирующем единичный фермент (наблюдается его дефицит). Примеры: акаталазия, болезнь Рефсума взрослых, гипероксалурия (тип I), гиперпиколовая ацидемия, глютаровая ацидурия (тип III), дефицит би(три)-функционального белка, ди- и тригидроксихолестанемия, псевдонеонатальная адренолейкодистрофия и X-сцепленная адренолейкодистрофия.

Механизмы патогенеза

Установлено, что развитие ПерБ связано с нарушениями:

- окисления ОДЦЖК, пристановой кислоты, ди- и тригидроксихолестановых кислот или окисления метаболитов жирных кислот;
- деградации фитановой и пипеколиновой кислот;
- транспорта белков-пероксинов через мембраны пероксисом и работой их рецепторов;
- синтеза плазмалогенов; при этом токсический эффект от накапливающихся в клетках метаболитов проявляется как атрофия коры надпочечников; демиелинизация белого вещества мозга и суданотропная лейкодистрофия с частичным периваскулярным накоплением лимфоцитов; фиброз печени.

Основные симптомы

При первом и втором классах ПерБ у больных наблюдается варьирующая экспрессивность симптомов, что связано с нозологией болезни. Например, тяжело протекает синдром Цельвегера, тогда как легкое течение отмечается при болезни Рефсума новорожденных, а средняя тяжесть болезни наблюдается в случае адренолейкодистрофии.

Клинические различия касаются времени манифестации, тяжести поражения нервной системы и продолжительности жизни.

Большинство ПерБ (15 из 17 нозологий) имеют выраженную неврологическую симптоматику. Основные симптомы: гепатомегалия, неврологические нарушения (задержка раннего психомоторного развития, мышечная гипотония, нейросенсорное снижение слуха), ретинопатия (дефекты пигментации сетчатки и побледнение дисков зрительных нервов) или катаракта, черепно-лицевой дисморфизм и (иногда) аномалии развития скелета (ризомиелический тип укорочения конечностей).

Отдельные нозологии пероксисомных болезней Синдром Цельвегера

Синдром Цельвегера (СЦ) - это гетерогенное заболевание, обусловленное мутациями в генах пероксинов 1-3, 5, 6 и 12 (гены PMP 70 и PMP35). Иногда выявляются делеция или инверсия в сегменте 7q11.3. Всего известны 11 групп комплементации СЦ.

Манифестация болезни начинается с рождения. У больных детей появляются судорожные припадки и геморрагический синдром. Характерны: внутриутробная гипотрофия (масса тела ниже 2500 г), черепно-лицевой дисморфизм: увеличенный в размерах лоб, монголоидный разрез глаз, периорбитальная полнота (припухлость) тканей, короткий вздернутый нос, микрогнатия. В первые месяцы жизни наблюдаются длительная желтуха и симптомы надпочечниковой недостаточности. Типичны резкая мышечная гипотония (вплоть до атонии) и поликистоз почек.

У всех больных выявляются пороки головного мозга (агенезия мозолистого тела, очаги демиелинизации в белом веществе мозга,

гидроцефалия, лизэнцефалия, полимикрогирия). Иногда наблюдаются врожденная катаракта и глаукома, пороки сердца и наружных половых органов. Во всех случаях характерна грубая задержка раннего психомоторного развития.

Продолжительность жизни больных резко снижена (обычно они умирают на первом году жизни).

При морфологическом исследовании биоптатов печени наблюдается резкое снижение или полное отсутствие пероксисом в клетках печени. Биохимические показатели - значительное снижение активности основных ферментов, участвующих в синтезе плазмалогенов (кожные фибробласты и эритроциты), метаболизме фитановой кислоты, бета-окислении жирных кислот, деградации пипеколоновой кислоты. Важный биохимический признак - повышение концентрации ОДЦЖК в моче.

Цельвегероподобный синдром

Цельвегероподобный синдром - это недостаточность пероксисомной 3-оксоацил-КоА-тиолазы. Симптоматика мало отличается от классического СЦ. Характерны те же клинические и биохимические признаки, но в клетках печени обнаруживаются нормальные пероксисомы, хотя их число уменьшено. Диагностика основана на выявлении сочетания основных симптомов (черепно-лицевой дисморфизм, мышечная гипотония, судороги, гепатомегалия с конъюгированной гипербилирубинемией, высокая концентрация ОДЦЖК и пристановой кислоты в плазме крови, изолированная недостаточность 3-оксоацил-КоА-тиолазы в фибробластах и биоптате печени).

Ген болезни картирован в сегменте 3p22-23. Выявлены мутации гена пероксисомной 3-оксоацил-КоА-тиолазы, приводящие к ее дефициту во всех тканях организма.

Неонатальная адренолейкодистрофия

Неонатальная адренолейкодистрофия - это гетерогенный синдром, сходный с СЦ. Описано 6 групп комплементации. На первый план выступает тяжелое течение болезни с признаками дегенерации ЦНС, проявляющейся демиелинизацией головного мозга.

Первичный молекулярно-генетический и биохимический дефекты не известны.

Болезнь Рефсума новорожденных

Инфантильная болезнь Рефсума - это гетерогенный синдром, сходный с СЦ, но с более легким течением и большей продолжительностью жизни. Первые 6 мес жизни выражены нарушения вскарм-

ливания, связанные с гепатомегалией, пролонгированной желтухой, гипохолестеринемией и гипотрофией. Поэтому кормить ребенка можно только через зонд.

Продолжительность жизни не превышает 1,5-3 лет.

Описаны две группы комплементации. Первичный молекулярногенетический и биохимический дефекты не известны.

Следует отметить, что с учетом особенностей течения указанных выше нозологий ПерБ можно выстроить схему снижения тяжести течения заболевания у больных детей: СЦ и цельвегероподобный синдром - неонатальная адренолейкодистрофия - болезнь Рефсума новорожденных.

Болезнь Рефсума взрослых

Болезнь Рефсума взрослых манифестирует в возрасте до 50 лет. Характеризуется накоплением фитановой кислоты в крови и клетках разных тканей вследствие недостаточности гидроксилазы фитановой кислоты. Проявляется высокой концентрацией белка в спинномозговой жидкости, мозжечковой атаксией, периферической полиневропатией, пигментным ретинитом. Не постоянны: пороки развития сердца и скелета, anosmia, ichthyosis, нейросенсорная глухота.

Первичный молекулярно-генетический и биохимический дефекты неизвестны.

Ризомиелическая точечная остеохондродисплазия

Ризомиелическая точечная остеохондродисплазия - это изолированная недостаточность дегидроксиацетонфосфатацилтрансферазы (алкилдегидроксиацетонфосфатсинтазы). Выделяют классическую форму (одна группа комплементации) и атипичную форму (две группы комплементации). Манифестация болезни происходит в неонатальном периоде, реже - на первом году жизни. Наблюдается острое течение. Большинство детей умирают на первом году жизни.

Фенотип: задержка роста, микроцефалия, плоское лицо с западающей переносицей, антимонголоидный разрез глаз, катаракта, диспропорциональное укорочение конечностей (преимущественно в проксимальных отделах), множественные контрактуры суставов, ихтиозоформная дисплазия кожи и alopecia. Характерны: тяжелая задержка психомоторного развития, изменения на КТ и МРТ головного мозга.

При этом заболевании наблюдаются нарушения биосинтеза плазмалогенов (вследствие дефицита дегидроксиацетонфосфата и алкилирующей дегидроксиацетофосфатсинтазы), окисления фитановой

кислоты, стимуляции зрелой формы тилазы пероксисом (без накопления ОДЦЖК в плазме крови).

Морфологически выявляется уменьшенное число или полное отсутствие пероксисом, увеличенные их размеры в клетках печени при неизменной их структуре в фибробластах.

На рентгенограмме - очаги точечной минерализации костей - кальцификаты или нарушение эндохондриального окостенения, оссификация вентральной и дорсальной части позвонков (исчезает после двухлетнего возраста), симметричное укорочение и деформация метафизов плечевой и бедренной костей.

Ген болезни не картирован. Предполагается биохимический дефект импорта пероксинов.

Х-сцепленная адренолейкодистрофия

Х-сцепленная адренолейкодистрофия относится к одной из наиболее распространенных форм НБО (частота - 1:20 тыс.). Характеризуется значительной вариабельностью возраста манифестации (от 2,5 до 10 лет), разной экспрессивностью признаков и прогрессивностью течения. Выделяют ряд форм. *Первая форма* встречается наиболее часто. Манифестация в детском возрасте (между 5 и 10 годами жизни). Характеризуется наиболее тяжелыми проявлениями: отсутствие зрения, речи и слуха, полная обездвиженность. Питание ребенка возможно только через зонд. В дальнейшем развиваются демиелинизация и воспалительные процессы в тканях мозга; появляются судороги. Смерть наступает через несколько лет. *Вторая форма* также часто встречается, начинается во взрослом возрасте. Характеризуется дисфункцией тазовых органов и прогрессирующим парапарезом вследствие поражения спинного мозга. При обеих формах может быть надпочечниковая недостаточность, проявляющаяся одновременно с неврологической симптоматикой.

Кроме этих форм выделяют: *болезнь Адисона* (без неврологических симптомов, но с характерной биохимической картиной Х-сцепленной адренолейкодистрофии), *подростковую форму* и *церебральную форму взрослых*. Все указанные пять форм могут встречаться в пределах одной семейной родословной.

Первичный молекулярно-генетический дефект - мутации структурного гена интегрального белка мембраны пероксисом (ген ALDP), обуславливающие дефицит этого белка в нейронах мозга, коре надпочечников, лейкоцитах, эритроцитах, фибробластах. Ген локализован в сегменте Xq28. Первичный биохимический дефект связан с

накоплением ОДЦЖК в плазме крови (вследствие нарушения бетаокисления в пероксисомах).

Псевдонеонатальная адренолейкодистрофия

Псевдонеонатальная адренолейкодистрофия - это недостаточность пероксисомной ацил-КоА оксидазы. Болезнь гетерогенна, имеет симптоматику, сходную с таковой неонатальной адренолейкодистрофии, но без признаков черепно-лицевого дисморфизма. Характеризуется ранним появлением судорог и выраженной задержкой психомоторного развития.

Ген болезни не локализован.

Дефицит би-(три-)функционального белка пероксисом

Дефицит би-(три-)функционального белка пероксисом имеет сходные признаки с неонатальной адренолейкодистрофией. Число и морфология пероксисом не изменены.

Накопление метаболитов в нервной ткани сопровождается интоксикацией, что морфологически проявляется демиелинизацией, микронодулярным циррозом, нарушениями цитоархитектоники и полимикрогирией головного мозга, фиброзом и холестазом печени.

Болезнь манифестирует на первом году жизни. Продолжительность жизни - до трех лет.

Ген не локализован. Предполагаются мутации би-(три-)функциональных белков во всех клетках, кроме эритроцитов.

Би- и тригидроксихолестановая ацидемия

Би- и тригидроксихолестановая ацидемия манифестирует в неонатальном периоде, проявляется гепатомегалией, тяжелой печеночной недостаточностью, отсутствием

психомоторного развития и роста, черепно-лицевым дисморфизмом. Характеризуется накоплением токсических метаболитов ди- и тригидроксихолестановой и пристановой кислот. Смерть наступает в возрасте от 6 мес до 2 лет.

Ген не локализован. Предполагается первичный биохимический дефект, связанный с недостаточностью холестаноил-Коа оксидазы.

Глютаровая ацидурия, тип III

Описан единичный случай глютаровой ацидурии III типа у новорожденной девочки - с затруднениями при кормлении, рвотой после приема пищи, задержкой развития.

Отмечалась повышенная экскреция с мочой глютаровой кислоты. Ген не локализован. В качестве первичного биохимического дефекта предполагается дефицит глютарат-Коа оксидазы.

Гипероксалурия, тип I

Гипероксалурия, тип I, отличается выраженным клиническим полиморфизмом. Выделяют неонатальную, детскую и взрослую формы, различающиеся тяжестью проявления. Сопровождается нефролитиазом и нефрокальцинозом, приводящими к ранней почечной недостаточности (до 20 лет) вследствие системного оксалоэксацитоза экстрапочечных тканей. Описаны артриты и атриовентрикулярная блокада. Больные умирают в течение одного года от уремии или других осложнений (гематурия, острая почечная колика).

Идентифицированы мутации структурного гена пероксисомной аланинглюксилат-аминотрансферазы (АГТ), приводящие к ее дефициту в печени. Ген локализован в сегменте 2q36-37. Описана мутация гена, приводящая не к снижению активности, а к нарушению компартиментализации фермента G630A в пероксисомах.

Гиперпиколовая ацидемия

Фенотип больного с гиперпиколовой ацидемией сходен с фенотипом при СЦ (см. выше). Гиперпиколовая ацидемия характеризуется высоким уровнем гиперпиколовой кислоты, сочетанием симптомов генерализованного поражения пероксисом и болезни Жуберта (дисплазия червя мозжечка, изменения печени, нарушения дыхания). Больные умирают в возрасте до трех лет. Первичный молекулярногенетический и биохимический дефекты не известны.

Акталаземия

Акталаземия, или болезнь Такахары, имеет доброкачественное течение, проявляющееся изъязвлением и воспалением слизистой оболочки полости рта. Частота распространения в Японии - 1:250 тыс. В 25-50% случаев болезнь осложняется гранулематозными псевдоопухолями в полости носа и придаточных пазухах. Ген болезни локализован в сегменте 11p13.

Биохимический дефект связан со снижением активности каталазы в эритроцитах.

Подходы к диагностике

Принцип диагностики ПерБ - это анализ сочетания данных клинического обследования и общих лабораторных данных. Основные дифференциально-диагностические признаки:

- морфологический и физиологический критерии: количество пероксисом и снижение их функции (см. выше);

- клинические данные: выраженная неврологическая симптоматика, надпочечниковая и печеночная недостаточность, в том
- числе неврологические расстройства, нарушения функций надпочечников и печени, снижение остроты зрения и слуха; часто манифестации болезни предшествуют: нарушения вскармливания, связанные с гепатомегалией и пролонгированной желтухой, задержка психомоторного развития; при осмотре пациентов в ряде случаев определяются арефлексия, гипорефлексия, мышечная (генерализованная) гипотония, нейросенсорная тугоухость, пигментная дегенерация сетчатки, судороги; лабораторные данные: увеличение концентрации в плазме крови ди- и тригидрокси-5-бета-холестановой кислоты (соответственно ДГХК и ТГХК), ОДЦЖК и фитановой кислоты, пристановой кислоты; определение гипохолестеринемии, повышения уровня трансаминаз, уровня связанного билирубина и некоторых факторов свертывания крови и др. К основным клинико-инструментальным и клиниколабораторным методам диагностики ПерБ относятся: аудиометрия, исследование глазного дна, электронная микроскопия биоптатов печени, ЭЭГ, КТ и МРТ головного мозга, УЗИ печени и почек.

Подходы к лечению

Методы радикальной терапии ПерБ не разработаны. В некоторых случаях - пересадка печени и почек (гипероксалурия, тип I). При X-сцепленной адренолейкодистрофии высокоэффективна гормонотерапия надпочечниковой недостаточности.

В остальных случаях ПерБ назначается симптоматическая терапия: купирование судорог антиконвульсантами, мышечных болей и спазмов - балкофеном, нормализация сна и т.д.

ХАРАКТЕРИСТИКА МИТОХОНДРИЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Митохондрии

Митохондрии впервые описаны Р. Альтманом в 1894 г., однако окончательное название «митохондрии» им дал К. Бенда в 1897 г. Митохондрии состоят из четырех компонентов: матрикс, окруженный внутренней мембраной (кристы и трубочки), межмембранное пространство и наружная мембрана. В матриксе содержатся кольцевая митохондриальная ДНК (мтДНК), специфические мРНК, тРНК и

собственные рибосомы, которые по размерам меньше, чем рибосомы цитоплазмы клетки. Митохондрии присутствуют во всех клетках, кроме зрелых эритроцитов. Их число в одной клетке может достигать нескольких сотен. Много митохондрий в ооцитах и, наоборот, в сперматозоидах их всего четыре, и они, как сказано выше, не проникают в яйцеклетку при оплодотворении.

Основная функция митохондрий - физико-химические реакции, связанные с тканевым дыханием и синтезом АТФ (аденозинтрифосфат), происходящим благодаря сопряжению процессов окисления и фосфорилирования. АТФ запасает и хранит энергию для окисления. Его синтез происходит на внутренних мембранах митохондрий, площадь которых многократно больше площади внешней мембраны за счет крист (гребней), выступающих в пространство матрикса.

Кроме указанных процессов, у митохондрий имеются функции: превращение лимонной кислоты; синтез аминокислот, гема, витаминов, липидов и пиримидинов; окисление жирных кислот. Обеспечение такого многообразия функций требует присутствия в митохондриях большого количества полипептидов, синтезируемых самой соматической клеткой (около 10%).

Геном митохондрий полностью расшифрован (см. главу 2).

Хемиосмотическая теория

Важной вехой в развитии биоэнергетики митохондрий стала хемиосмотическая теория, предложенная П. Митчеллом в 1961 г. Согласно этой теории, формирование запасов энергии в митохондриях происходит в результате электрохимической активности протонов, их перемещения из матрикса через внутреннюю мембрану в межмембранное пространство с помощью протонного насоса, функционирование которого зависит от переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий в ходе окисления.

В дыхательной цепи митохондрий участвуют пять комплексов субъединиц, кодируемых как ядерной ДНК, так и мтДНК. Их общее количество достигает 10-35 и 1-7 субъединиц соответственно. При этом небольшая по размерам молекула мтДНК кодирует 13 полипептидов, входящих в состав четырех из пяти ферментных комплексов. Из них 7 полипептидов включены в комплекс I (NADH-дегидрогеназа с коэнзимом Q оксидоредуктазы), 1 полипептид служит субъединицей комплекса III (коэнзим Q с цитохром-с-оксидоредуктазой); 3 полипептида являются субъединицами комплекса IV (цитохром-с-оксидазы) и 2 полипептида - субъединицами комплекса V (АТФ-синтетазы).

В свою очередь, субъединицы белков комплекса II (в том числе сукцинатдегидрогеназа) кодируются исключительно генами ядерной ДНК. Все белки митохондрий, кодируемые ядерной ДНК, синтезируются в рибосомах цитоплазмы и транспортируются в одно из четырех структурных образований: внутреннюю и наружную мембраны, матрикс и межмембранное пространство. На рис. 72 приведена схема пространственного расположения пяти комплексов дыхательной цепи митохондрий.

Митохондриальные болезни Общие данные

МТБ - это обширная группа заболеваний, обусловленных разобщением процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях. Поэтому их часто называют болезнями окислительного фосфорилирования или OXPHOS-болезнями.

Среди МТБ выделяют четыре класса, включая один класс ненаследственных (приобретенных) и три класса наследственных МТБ. Первый класс - приобретенные болезни, связанные с токсическим действием на митохондрии. Второй класс - болезни, обусловленные дефектами

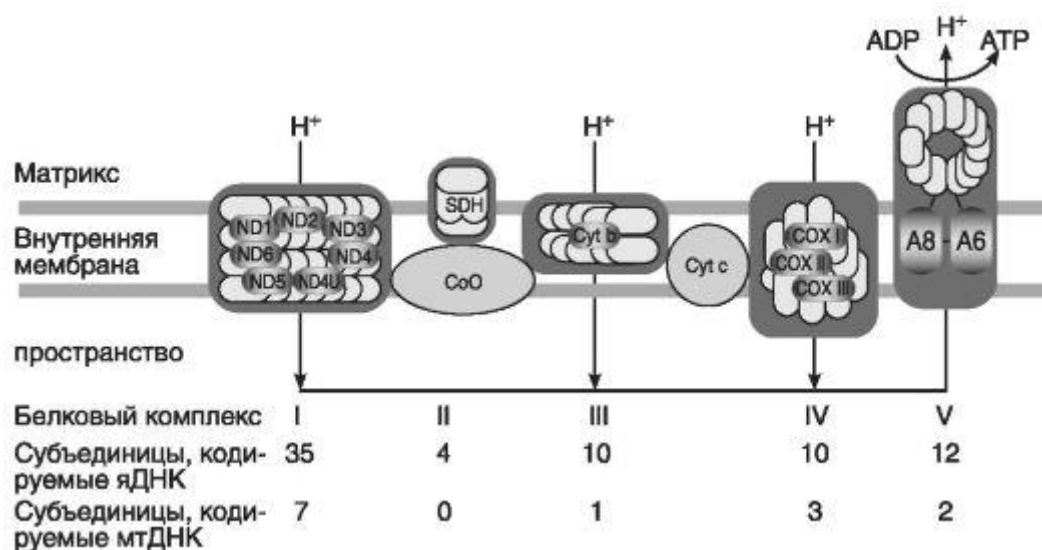


Рис. 72. Митохондриальная дыхательная цепь (по Васильеву В.Б., 2005). Число субъединиц указано под стрелками. Протоны H^+ перекачиваются из матрикса в межмембранное пространство с помощью комплексов I, II, IV. Возвращение в матрикс осуществляется комплексом V (АТФ-синтетаза) и сопровождается образованием АТФ. Коэнзим Q10 (CoQ_{10}) и цитохром c ($Cyt\ c$) - протеины, кодируемые яДНК

ядерной ДНК: дефицит субстратов транспорта; дефицит субстратов утилизации; нарушение цикла Кребса; нарушение процессов окисления и фосфорилирования; дефекты дыхательных цепей; дефекты белков, импортируемых в митохондрии. Третий класс - болезни, обусловленные дефектами мтДНК: точковые мутации генов, кодирующих структурные белки; большие по размерам делеции генов структурных белков. Четвертый класс - болезни, связанные с интергеномными дефектами. Сюда относится одно аутосомно-доминантное заболевание, ассоциированное с множественными делециями мтДНК. Механизмы патогенеза

При OXPHOS-болезнях в митохондриях нарушаются один или сразу несколько биохимических процессов.

- Транспорт субстратов, контролируемый транслоказами, которые переносят глутамат, дикарбоновые кислоты, длинно- и среднецепочечные жирные кислоты, ионы кальция.
- Окисление субстратов мультиферментным пируватдегидрогеназным комплексом; дефицит этого комплекса развивается вследствие мутаций, обуславливающих накопление пирувата, переходящего в лактат и проявляющегося лактат-ацидозом.
- Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса), центральный путь метаболизма углеродсодержащих молекул, ведущий к полному аэробному разложению пирувата.
- Работа дыхательной цепи - из-за появления изолированных и сочетанных ее дефектов. Известно, что дыхательная цепь митохондрий состоит из пяти мультиферментных комплексов, из которых четыре осуществляют транспорт электронов, а пятый катализирует АТФ. Эта цепь находится под двойным контролем (со стороны ядерной и мтДНК). В ней участвуют пять цитохромов. При этом электроны транспортируются в дыхательную цепь, а освобождающаяся энергия прокачивает протоны через внутреннюю мембрану в межмембранное пространство митохондрий. Очевидно, что в любом из перечисленных звеньев дыхательной цепи митохондрий может возникнуть дефект.
- Сопряжение процессов окисления и фосфорилирования, процессов энергетического обмена в митохондриях. Показано, что нарушения процессов энергетического обмена в митохондриях обуславливают не только развитие OXPHOS-болезней (их 21 нозология), но и развитие многих МБ и БНП, симптоматика которых тесно связана с энергетической недостаточностью тканей и орга-

нов, сильно зависящих от запасов АТФ. Среди таких органов и тканей: головной мозг, островки Лангерганса, сердечная мышца, скелетная мускулатура, сетчатка глаз и др. Дегенеративные изменения на фоне сниженного синтеза АТФ также происходят в митохондриях пожилых людей при развитии болезней Альцгеймера и Паркинсона, кардиомиопатий и сахарного диабета. Кроме того, в последние годы отмечено, что к механизмам процессов старения и связанных с ними дегенеративных изменений относятся 4 события, сопровождающих нарушения окислительного фосфорилирования, в том числе:

- дестабилизация митохондрий как главного источника энергии для всех тканей и органов;

- существенное сокращение запасов АТФ в митохондриях;
- появление и накопление мутаций в ядерной ДНК и мтДНК, участвующих в сопряжении процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях;
- возрастное снижение интенсивности процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях.

Характерной особенностью МТБ у детей является отсутствие какой-либо симптоматики в первые годы жизни, что объясняется гетероплазмией или одновременным присутствием в клетках растущего организма сотен митохондрий, содержащих как нормальную, так и мутантную мтДНК. С возрастом количество мутантной мтДНК в клетках нарастает, и когда оно достигает некоего «порогового уровня», энергетический метаболизм таких клеток уже не обеспечивает потребности энергоемких тканей и органов в АТФ, что ведет к их дегенерации и появлению OXPHOS-болезней.

Следует отметить, что накопление мутантных копий в мтДНК объединяет эти болезни с болезнями экспансии нуклеотидных повторов, в основе которых лежит накопление кодирующих и некодирующих кодонов (три-, тетра- и пентаплетов) в ядерной ДНК, и в случае превышения их «порогового уровня» развивается полная или динамическая мутация (см. главу 27). Чем старше человек, тем OXPHOS-болезни, как правило, тяжелее протекают и заканчиваются летальным исходом.

Причины МТБ хорошо изучены: это точковые мутации и обширные делеции в мтДНК или ядерной ДНК, в которой возникают межгеномные сигнальные эффекты, прямо или косвенно приводящие к феномену деплеции или истощения митохондрий.

Основные симптомы

Основные симптомы МТБ связаны с поражением нервной системы, что обусловлено высокой потребностью в энергии нервной ткани и высокой чувствительностью нейронов к недостатку их энергоснабжения. Характерны раннее начало болезни на втором-третьем году жизни ребенка, прогрессирующее течение и вовлечение многих систем организма. Симптомы со стороны ЦНС: атаксия, задержка психомоторного развития, миоклонус-эпилепсия, мышечная гипотония или гипертония, а также деменция и инсультоподобные состояния. Часто поражаются: сердце (кардиомиопатия, нарушение проводимости миокарда) и органы зрения (атрофия зрительных нервов, катаракта, наружная офтальмоплегия, пигментная дегенерация сетчатки). Возможны: гепатомегалия, диарея, нанизм, непереносимость белков, поражение поджелудочной железы и других органов, тубулопатия.

Лабораторные данные: ацидоз, изменение соотношения пируват/ лактат с преобладанием пирувата (в норме оно равно 20). Отмечается повышение концентрации кетоновых тел.

Отдельные формы митохондриальных болезней ARP-синдром

ARP-синдром - это синдром атаксии, нейропатии и пигментного ретинита. Описан в 1990 г. Симптоматика проявляется с трехлетнего возраста. Характерны: атаксия, деменция, задержка развития, слабость в проксимальных отделах конечностей, сенсорная нейропатия, судороги, пигментный ретинит. Молекулярно-генетический дефект - точковая мутация мтДНК.

Атрофия Лебера

Наследственная оптическая нейроретинопатия Лебера (LHON) характеризуется быстро нарастающей слепотой у лиц в возрасте до 20 лет, вызванной двусторонней атрофией

зрительного нерва. В дальнейшем развивается ретробульбарная нейропатия. При исследовании глазного дна выявляются отек диска зрительного нерва и поражение сосудов сетчатки (микроангиопатия). У больных наблюдаются двигательные, неврологические и психические расстройства: гиперрефлексия, дистония, нарушения координации, периферическая нейропатия, тремор. Преобладают больные мужского пола.

При КТ выявляется общая атрофия коры головного мозга. На ЭКГ - нарушения сердечной проводимости и сократимости. Молекулярно-генетический дефект - точковая мутация. Описаны

четыре типа мутаций мтДНК, наиболее частой из которых является замена гуанина на аденин в положении 11 778. Это основание входит в состав нуклеотидов гена, кодирующего четвертую субъединицу НАДН-дегидрогеназы. Такая замена развивается в ряде случаев у пациентов с гетероплазмией, имеющей тенденцию к гомоплазмии по мутантной мтДНК. При этом в ходе трансляции мутантной мтДНК аргинин в положении 340 заменяется на гистидин.

Также предполагается существование X-сцепленного фактора, модифицирующего экспрессию дефекта мтДНК. Аналогичный дефект отмечался при миссенс-мутациях мтДНК, и всего были выделены три критерия, позволяющих считать такие мутации непосредственно связанными с атрофией Лебера.

В числе трех морфологических и биохимических признаков синдрома LHON значатся: гетероплазмия с нарастанием доли мутантной мтДНК; более высокая доля мутантной мтДНК у больных пациентов, чем в митохондриях здоровых лиц; замена эволюционно консервативной аминокислоты, постоянно присутствующей в нормальном белке.

При анализе семейных родословных у больных часто встречаются точковые мутации мтДНК, последовательно накапливающиеся в поколениях одной семьи, что, по-видимому, происходит в результате снижения эффективности переноса электронов в целом в дыхательной цепи митохондрий.

Болезнь Кирнс-Сэйра

Болезнь Кирнс-Сэйра известна с 1958 г. Большинство случаев спорадические. Характерно начало в первом десятилетии жизни. Основные симптомы: гиперпаратиреозидизм, мозжечковые нарушения (атаксия), нарушение сердечной проводимости, пигментная ретинопатия, прогрессирующая офтальмоплегия. Реже встречаются: гипопаратиреоз, изолированный дефицит гормона роста, низкий рост, сахарный диабет, снижение слуха, судороги, УО. Диагноз ставится при обнаружении лактат-ацидоза и определении в биоптате мышц РКМВ.

При ДНК-анализе выявляются крупные делеции мтДНК (предполагается, что это результат мутации в зиготе).

Болезнь Лея

Болезнь Лея - это подострая некротизирующая энцефаломиелопатия с атаксией, гипотензией, мышечной слабостью, нарушениями дыхания, недостаточной массой тела, пониженной остротой

зрения и слуха. Болезнь манифестирует в период новорожденности или на первом году жизни. Наблюдаются как бессимптомные, так и тяжелые формы. Выделяют неонатальную и позднюю формы. Неонатальная форма характеризуется респираторным

дистресс-синдромом, мышечной гипотонией, судорогами, трудностями вскармливания. Смерть наступает в первые недели или на первом году жизни ребенка.

Поздняя форма характеризуется апноэ, атрофией зрительных нервов и косоглазием, задержкой роста, мозжечковыми нарушениями, рвотой, судорогами, тетрапарезом.

Молекулярно-генетический дефект - делеция мтДНК, приводящая к дефициту пируватдегидрогеназного комплекса и цитохром С-оксидазы.

Доминантно наследуемая митохондриальная миопатия

Доминантно наследуемая митохондриальная миопатия наиболее часто встречается как форма МТБ с поздним началом. Она манифестирует на третьем десятилетии жизни с проявления офтальмоплегии и слабости мышц верхних и нижних конечностей.

В дальнейшем присоединяется двусторонняя катаракта.

MELAS-синдром

MELAS-синдром также называют синдромом митохондриальной миопатии, энцефалопатии, молочнокислого ацидоза (лактатацидоза) и инсультоподобных эпизодов. Описано более 70 случаев. Синдром развивается до 40-летнего возраста. Характерны: деменция, инсультоподобные приступы, мигреноподобные боли, судороги. Нередки: гемиянопсия и гемипарезы, мышечная слабость в конечностях, низкий рост, снижение слуха. У всех больных выявляются лактат-ацидоз и РКМВ в биоптатах мышц. У каждого третьего больного обнаруживаются кальцификаты базальных ганглиев, а у каждого десятого - прогрессирующая наружная офтальмоплегия.

Молекулярно-генетический дефект - точковая мутация мтДНК.

MERRF-синдром

MERRF-синдром - это прогрессирующая миоклональная эпилепсия с РКМВ. Описано 25 случаев. Основные симптомы: деменция, мозжечковые нарушения (прогрессирующая атаксия), нарушение глубокой чувствительности, приступы генерализованных судорог, снижение слуха. Иногда выявляются атрофия зрительных нервов и низкий рост.

На аутопсии - губчатая дегенерация задних отделов головного мозга и спинocerebellарного тракта. В биоптате мышц - РКМВ. Молекулярно-генетический дефект - точковая мутация мтДНК (см. также главу 27).

MIMYCA-синдром

MIMYCA-синдром - это синдром кардиомиопатии или миопатии без вовлечения ЦНС. Молекулярно-генетический дефект - точковая мутация мтДНК.

Синдром Альпера

Синдром Альпера - это прогрессирующая детская полидистрофия. Характерны: деменция, дисфункция печени, слепота, спазмы, судороги, обусловленные специфической дегенерацией тканей головного мозга.

Молекулярно-генетический дефект не установлен. Синдром Вольфрама

Синдром Вольфрама характеризуется манифестацией в возрасте от одного года до второго десятилетия жизни. Характерны: атрофия зрительных нервов, задержка психомоторного развития, отставание в росте, пигментная дегенерация сетчатки, сахарный диабет.

Молекулярно-генетический дефект - делеция мтДНК.

Синдром Пирсона

Для синдрома Пирсона характерны: гипопластическая анемия и панцитопения раннего детского возраста в сочетании с атрофией селезенки и фиброзом поджелудочной железы. Болезнь обусловлена делецией мтДНК.

Хроническая прогрессирующая наружная офтальмоплегия Хроническая прогрессирующая наружная офтальмоплегия клинически напоминает синдром Кирнс-Сэйра. Сочетается с блефароптозом, параличом наружных мышц глазного яблока и расстройствами ЦНС. Молекулярно-генетический дефект не установлен.

Подходы к диагностике

Клиническое проявление отдельных форм МТБ может изменяться, например, в случаях «обменов» симптомами между разными нозологиями, что затрудняет их диагностику. Только в последние годы, когда были идентифицированы разные типы мутаций мтДНК, удалось систематизировать нозологии с учетом обуславливающих их развитие молекулярных механизмов, связанных с расстройствами процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях, и каждый синдром стал определяться в зависимости от конкретной мутации. Молекулярно-

генетическая диагностика МТБ направлена на идентификацию мутаций мтДНК, включая выявление нуклеотидных замен в генах, кодирующих полипептиды (миссенс-мутации); нуклеотидных замен в генах, кодирующих тРНК; делеций и вставок в мтДНК; мутаций, изменяющих число копий мтДНК. Важными для диагностики являются морфологические изменения в мышечной ткани - РКМВ. Этот признак более свойственен состояниям, обусловленным крупными делециями мтДНК. Основными диагностическими тестами служат:

- обнаружение в биоптатах тканей гетероплазии или неравномерного распределения митохондрий с мутантной ДНК по тканям в эмбриональном периоде, что ведет к поражению мышц, печени и др.;
- выявление при ДНК-анализе в клетках разных тканей протяженных делеций или точковых мутаций мтДНК, которые реплицируются быстрее и поэтому быстро накапливаются;
- повышение концентрации метаболитов (в крови и мышечных биоптатах), являющихся биохимическими маркерами нарушений окислительного фосфорилирования;
- нарушение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий в мышечном биоптате (дефицит дегидрогеназы, цитохромс-оксидазы).

Подходы к лечению

Лечение МТБ в основном симптоматическое. Оно направлено на снятие явлений ацидоза и выведение лактата. Применяемая терапия: жирная диета (без углеводов), витамины С, К и У, кокарбоксилаза, коэнзим Q.

В последние годы был разработан патогенетический подход: стимуляция продукции АТФ и снижение токсического воздействия патологических метаболитов.

Такое лечение ведется в соответствии с утвержденными протоколами, предусматривающими ряд обязательных назначений:

- купирование церебрального лактат-ацидоза дихлоацетатом (таблетки или внутривенные инъекции): соответственно 15 мг несколько раз или 200 мг один раз в день;
- прием коэнзима Q10 в дозе 100 мг (на три порции в день) с добавлением сукцината или прием идебенола (сходен с коэнзимом Q10);
- витаминотерапия аскорбатом (витамин С) в дозе 1 г в день, менадионом (витамин К3) в дозе 40-80 мг в день, тиамином (300 мг в день), рибофлавином (100 мг в день) и витамином Е (антиоксидант) по 500 мг 2 раза в день.

ГЛАВА 27 ЭКСПАНСИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОВТОРОВ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КСИЛОТЫ И БОЛЕЗНИ ЭКСПАНСИИ

Общие данные

В хромосомной ДНК выделяют два класса последовательностей нуклеотидов (см. главу 2): уникальные последовательности или экзоны (они реплицируются и транскрибируются), и повторяющиеся последовательности или интроны (они реплицируются, но, как правило, не транскрибируются).

Последовательности ДНК разнообразны по спектру: ди-, три-, тетра-, пента-, гекса- и полинуклеотидные. При этом ди-, тетра- и пентануклеотидные последовательности редко обнаруживаются в экзонах, тогда как три- и гексануклеотидные последовательности в них выявляются часто, что объясняется способностью первых и неспособностью вторых к сдвигу рамки считывания в ходе транскрипции. Установлена прямая связь между длиной (размером) последовательности, ее стабильностью и изменчивостью в популяции. При этом размер последовательности важный, но не единственный фактор, влияющий на ее стабильность.

В свою очередь, стабильность экзонов и интронов связана со степенью их «чистоты». Например, информативность последовательности со вставками нуклеотидов или маркерами, нарушающими ее непрерывность, значительно ниже, чем у последовательностей без таких вставок. Потеря вставок в экзонах - это, как правило, результат формирования делеции или однонуклеотидной замены (например, аденина на цитозин), что ведет к образованию неканонической (не «уотсон-криковской») пары азотистых оснований.

Наряду с информативностью последовательностей ДНК показана ассоциативная связь между их нестабильностью и степенью совершенства. Так, нормальные аллели гена SCA1 (ген спинocerebellарной атаксии, тип I) имеют большую длину повтора CAG, содержат 1-3 вставки повтора CAT, тогда как аллели с экспансией копий повторов характеризуются непрерывными трактами CAG.

Вместе с тем, было показано, что наряду с уникальными последовательностями транскрипционной активностью обладает небольшая часть повторяющихся последовательностей нуклеотидов (их не менее 1%) - они оказались способными кодировать рРНК, тРНК и даже гистоны (см. главу 1). Например, такая способность наблюдалась у ряда кодирующих и не кодирующих последовательностей ДНК, если в них сверх нормы возрастало количество копий (одинаковых повторов), состоящих из три-, тетрануклеотидов ДНК и более, которые экспрессировались в протяженные цепи-тракты полипептидов, сформированных из одинаковых последовательностей аминокислот: аланина, глицина, глутаминовой кислоты, лейцина, пролина или серина. В совокупности такие тракты занимают 75% общего объема всех аминокислотных трактов,

представляющих собой последовательности из пяти и более идентичных аминокислотных остатков, которые определяются в клетках и тканях как белки с общей длиной около 400 аминокислот - это одна из универсальных характеристик феномена экспансии (см. ниже). Впервые такие протяженные аминокислотные тракты-повторы были описаны V. Verkerk и соавт. в 1991 г. при синдроме Мартина-Белл.

Для молекулярной медицины особенно значимыми оказались тринуклеотидные повторы ДНК, экспрессирующиеся в полиглутаминовые и полиаланиновые тракты аминокислотных остатков, обуславливающие развитие 18 нозологий, а также микросателлитные повторы, экспрессирующиеся в аминокислотные последовательности полипептидов, обуславливающих развитие еще 9 нозологий (всего 27 нозологий).

Результатом анализа этих необычных данных стало открытие нового биологического феномена - экспансии нуклеотидных повторов, роста числа их копий в геноме человека, а также нового класса болезней экспансии.

ФЕНОМЕН ЭКСПАНСИИ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОВТОРОВ И ЕГО ОСОБЕННОСТИ

Феномен экспансии нуклеотидных повторов имеет ряд характерных особенностей.

Универсальные характеристики

1. Кодирующие и некодирующие нуклеотидные повторы обнаруживаются в генах нормальных индивидов, они полиморфны по числу содержащихся в них копий повторов, что объясняет приобретение токсических функций молекулами агрегатов моноаминокислотных трактов, сформировавшихся в ходе экспансии.

2. Нуклеотидные повторы располагаются в разных областях генов, в том числе в промоторной области (гены FMR1 и FMR2), транскрибируемой, но нетранслируемой части гена (ген DMPK), экзонах (гены нейродегенеративных заболеваний) и интронах (ген FRDA);

3. Отмечается наличие порога предрасположенности к экспансии, после которого начинается генетическая и фенотипическая нестабильность (до порога - норма или состояние премутации, после порога - полная или динамическая мутация).

4. В случае превышения порога предрасположенности к экспансии наблюдается (одномоментное, скачкообразное) появление дополнительных копий повтора.

5. Не все нуклеотидные повторы предрасположены к нестабильности, которая зависит от нуклеотидного состава повторов, состояния кариотипа (хромосомного окружения) и биохимического статуса клетки. Зависимость стабильности повторов от их нуклеотидного состава связана со способностью повторов к образованию вторичных структур (повторы типа CNG_n, где n - число повторов), которые образуют «несовершенные шпильки», стабилизированные взаимодействием как канонических пар оснований (АТ- и ГЦ-пары), так и неканонических пар оснований (другие сочетания двух азотистых оснований).

Если шпильки не образуются, то предрасположенность к экспансии резко снижается. По-видимому, здесь играет роль некий энергетический барьер, необходимый для образования шпилек. Вероятно, что этот энергетический барьер тесно связан с функцией тканевого (митохондриального) дыхания (см. главу 26).

В связи с такой характеристикой феномена экспансии был сделан вывод, что стабильность структур, образованных разными повторами, хотя и различается, но соответствует определенной шкале. В случае повтора CGG такая шкала выглядит как уравнение:

CGG > CCG = CTG > CAG

В этом уравнении первый повтор обладает наибольшим потенциалом для образования шпилек и демонстрирует наименьший для

всех известных тринуклеотидных повторов уровень репликативного скольжения (см. ниже).

6. Последовательность из 5 идентичных аминокислотных остатков и более определяется как полиаминокислотный тракт или белок длиной 400 аминокислот.

В протеоме человека содержатся 20% белков, в составе которых обнаруживается по крайней мере один полиаминокислотный тракт. В таких трактах-повторах почти не встречаются аминокислоты аргинин, валин, изолейцин, метионин, тирозин, фенилаланин и цистеин. В то же время лейцин встречается в 19% белков с одним полиаминокислотным трактом. При этом исключительным правилом для человека является вхождение полилейциновых повторов в сигнальные пептиды (см. главу 8).

7. Процесс экспансии копий нуклеотидных повторов связан с нарушениями систем репарации ДНК. Однако механизмы, приводящие к нестабильности повторов, и в том и в другом случае различаются.

8. Экспансия копий кодирующих и некодирующих нуклеотидных повторов сопровождается феноменом антиципации - это увеличение тяжести течения болезни по мере роста числа копий повторов. Одновременно наблюдается прямая корреляция между ростом числа копий повторов и временем манифестации заболевания.

Уникальные характеристики

1. Наличие одинаковых нуклеотидных повторов при разных нозологиях, проявляющихся разными патологическими фенотипами, обусловлено мутациями в разных генах.

Всего 9 болезней экспансии кодирующих повторов связаны с полиглутаминовыми трактами, образовавшимися в результате экспансии повтора CAG (кодирует глутамин в транслируемых областях генов). Включение таких трактов в структуру белков обуславливает их неправильное функционирование в ходе ДНК-белковых и белокбелковых взаимодействий и развитие патологических фенотипов.

Две болезни полиглутаминовых трактов обусловлены экспансией копий повтора CGG (гены FraXA и FraXE).

В свою очередь, из 9 болезней экспансии, связанных с образованием полиаланиновых трактов, четыре заболевания обусловлены полиморфизмом длин повторов GCA и GCT (гены: PABPM, RUNX2, ZIC2 и HOXA13). В редких случаях такие полиморфизмы связаны с дупликациями или делециями целых блоков смешанных повторов (GCN)_n.

2. Кодирующие и некодирующие нуклеотидные повторы в случае болезней экспансии наследуются, как правило, по доминантному типу. Чтобы вызвать патологический фенотип, достаточно мутации в одном аллеле гена. Исключением из этого правила является прогрессирующая миоклонус-эпилепсия, обусловленная некодирующим повтором и наследуемая по рецессивному типу (см. MERRF-синдром в главе 26).

3. При болезнях экспансии, обусловленных кодирующими повторами ДНК, их копии в ряде случаев являются функционально полноценными кодонами генетического кода. Вместе с тем, они могут кодировать аминокислоты, из которых могут быть сформированы

моноаминокислотные тракты. При этом изменение числа копий таких кодонов не ведет к сдвигу рамки считывания в ходе транскрипции.

4. Мутантные аллели при отдельных болезнях экспансии сцеплены с ломкими сайтами хромосом, называемыми маркерными сайтами, например, при синдроме Мартина-Белл - это сайты FraXF, Fra16A, Fra16B и Fra11. Такая особенность свидетельствует в пользу «эффекта родоначальника» при возникновении и сохранении мутаций в популяции.

5. По мере роста числа повторов мутантные аллели проявляют митотическую и мейотическую нестабильность.

6. Митотическая нестабильность проявляется тканевым (соматическим) мозаицизмом. Она обусловлена мутантными аллелями с разным числом копий повторов, проявляющими свое действие в одной или сразу нескольких тканях, например, при миотонической дистрофии и синдромах FraXA и FraXE. В частности, в первом случае соматический мозаицизм обнаружен у 13-16-недельных плодов, что выразилось у них в разной длине повторов, сохранившейся в течение всей жизни.

7. Мейотическая нестабильность зависит от пути передачи мутантного аллеля по отцовской или материнской линии. В первом случае она проявляется быстрее (например, при нейродегенеративных заболеваниях), чем во втором случае (например, при миотонической дистрофии).

Молекулярные механизмы и модели экспансии

В последние годы предложен ряд моделей, характеризующих молекулярные механизмы феномена экспансии: репликативная, комбинативная и рекомбинационная модели.

Репликативная модель

Репликативная модель приведена на рис. 73.

Эта модель основана на модели репликации ДНК с участием фрагментов Оказаки (см. главу 2). Она свидетельствует, что динамическая мутация может быть результатом нарушения функционирования ДНК-полимеразы во время репликации, предшествующей митозу и мейозу. Фрагменты Оказаки имеют среднюю длину 150-200 н.п. Они участвуют в синтезе отстающей (запаздывающей) цепи ДНК, тогда как на основной (лидирующей) цепи синтез идет непрерывно. В данном случае при наличии на 3'-конце протяженной монотонной последовательности будет наблюдаться скольжение вновь синтезированной нити относительно матричной нити ДНК.

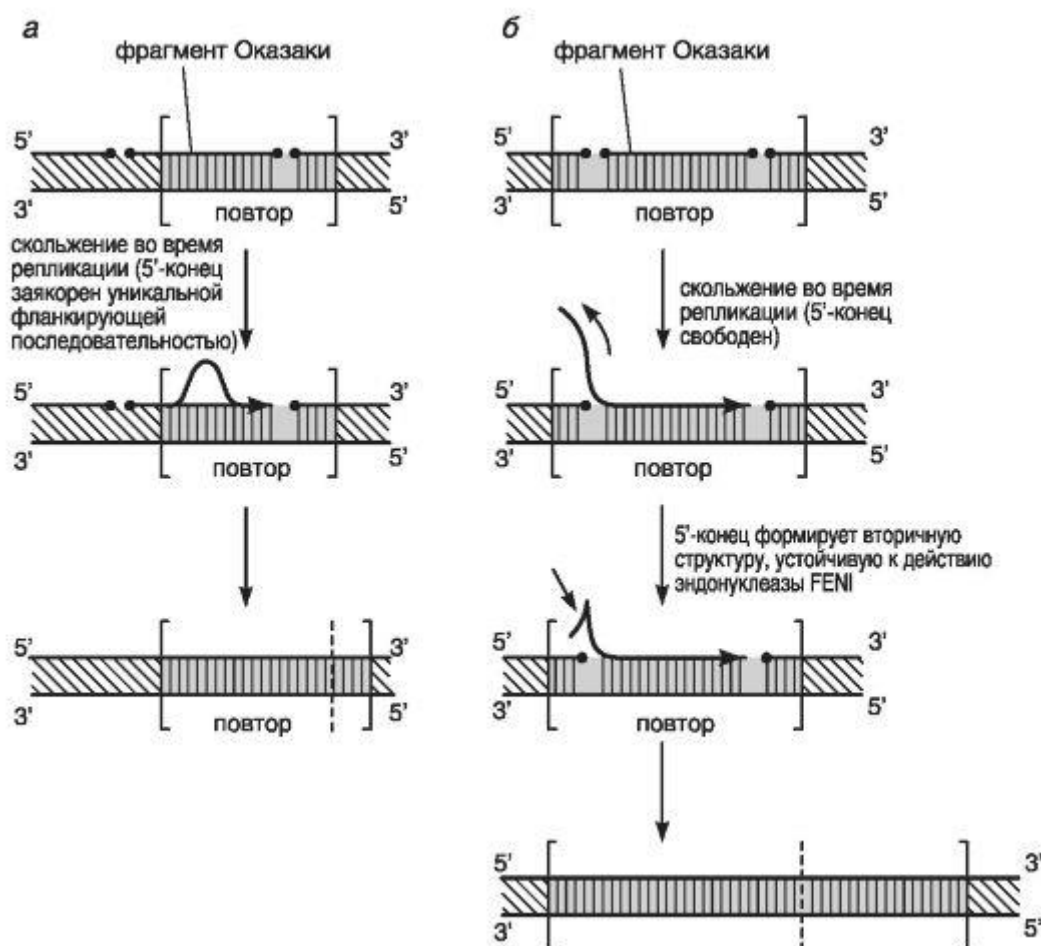


Рис. 73. Модель экспансии повторов на запаздывающей цепи ДНК (по Eichler E.E. et al., 1994)

При этом возможны 2 варианта: либо часть фрагмента Оказаки (например, только 3'-конец), либо весь фрагмент целиком находятся в пределах повтора. Первый вариант: 5'-конец фрагмента Оказаки фиксирован уникальной последовательностью ДНК или AGG-вставками, другой 3'-конец фрагмента Оказаки свободно скользит вдоль комплементарной цепи, образуя вторичные структуры.

Второй вариант: совершенный или «чистый» повтор длиной 70 триплетов не фиксирован по своим краям уникальными последовательностями и также свободно скользит вдоль комплементарной цепи, образуя шпильки.

Высказано предположение, что при обоих вариантах уменьшенный уровень репликативного скольжения лежит в основе мутационного процесса при экспансии числа копий повторов.

Таким образом, репликативная модель экспансии у человека предполагает, что динамическая мутация может быть результатом нарушения функционирования ДНК-полимеразы во время репликации, предшествующей митозу и мейозу.

Комбинативная модель

Изменение длин tandemных повторов может быть результатом неравного кроссинговера (см. главу 5). Однако такая экспансия, во-первых, не сопровождается обменом фланкирующих последовательностей ДНК и, во-вторых, нельзя исключить неравный

кроссинговер между сестринскими хроматидами, при котором в одинаковой степени может произойти как экспансия, так и сокращение длин повторов, что экспериментально не подтверждено.

Рекомбинационная модель

Наиболее обоснованной считается модель экспансии в результате рекомбинации или генной конверсии (см. главу 5).

Генная конверсия - это нереципрочный обмен между сестринскими хроматидами одной хромосомы или отклонение фактического обмена от ожидаемого теоретического обмена. Она может быть вызвана двухнитевыми разрывами вблизи нуклеотидных повторов

ДНК.

Не исключено, что генная конверсия может индуцироваться аномальной репликацией повторов и сопровождаться кроссинговером. В результате генной конверсии образуются как удлинённые, так и укороченные повторы.

Однако в отличие от неравного кроссинговера при генной конверсии это равновесие сдвигается в сторону преобладания нуклеотидных последовательностей с экспансией повторов.

На рис. 74 приведены модели генной конверсии, вызванной двухнитевыми разрывами ДНК.

Проблемы и пути определения механизмов патогенеза экспансии

В решении проблем патогенеза экспансии копий нуклеотидных повторов нет полной ясности. Экспансия реально существует при наличии в клетках стабильных систем репарации ДНК. Поэтому речь может идти о несостоятельности локальной репарации ДНК, зависящей от различий в генетическом и биохимическом микроокружении нуклеотидных повторов. В пользу такого предположения свидетельствуют две сходные по клинике, но разные по этиологии нозологии: одна - это прогрессирующая миоклонус-эпилепсия (если считать, что нет дефектов репарации), а другая - это митохондриальная миоклонус-эпилепсия с РКМВ, сопровождающаяся дефектами репарации или MERRF-синдром.

В пользу перспективности этого пути указывают данные о том, что все 27 нозологий болезней экспансии относятся к МБ человека. Как известно, в последние годы были показаны ранее неизвестные механизмы патогенеза многих МБ (см. главы 26, 28 и 29).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЕЗНЕЙ ЭКСПАНСИИ

БЭ обусловлены ростом числа копий кодирующих и некодирующих повторов ДНК. В основном это тринуклеотидные повторы. Однако имеются заболевания, обусловленные тетра-, пента- и двенадцатинуклеотидными повторами (см. ниже).

Выделены четыре типа классификаций болезней экспансии: А,

Б, В и Г.

- А. Классификация в зависимости от эффекта мутантного гена.

В основу классификации положено деление БЭ на два класса.

- Первый класс - болезни, обусловленные мутациями с эффектом «минус». Такие мутации приводят к нарушениям экспрессии генов: при атаксии Фридрейха (ген X25), миотонической дистрофии (гены DMPK и ZNF9), прогрессирующей миоклонус-эпилепсии (ген CSIB) и УО, синдроме Мартина-

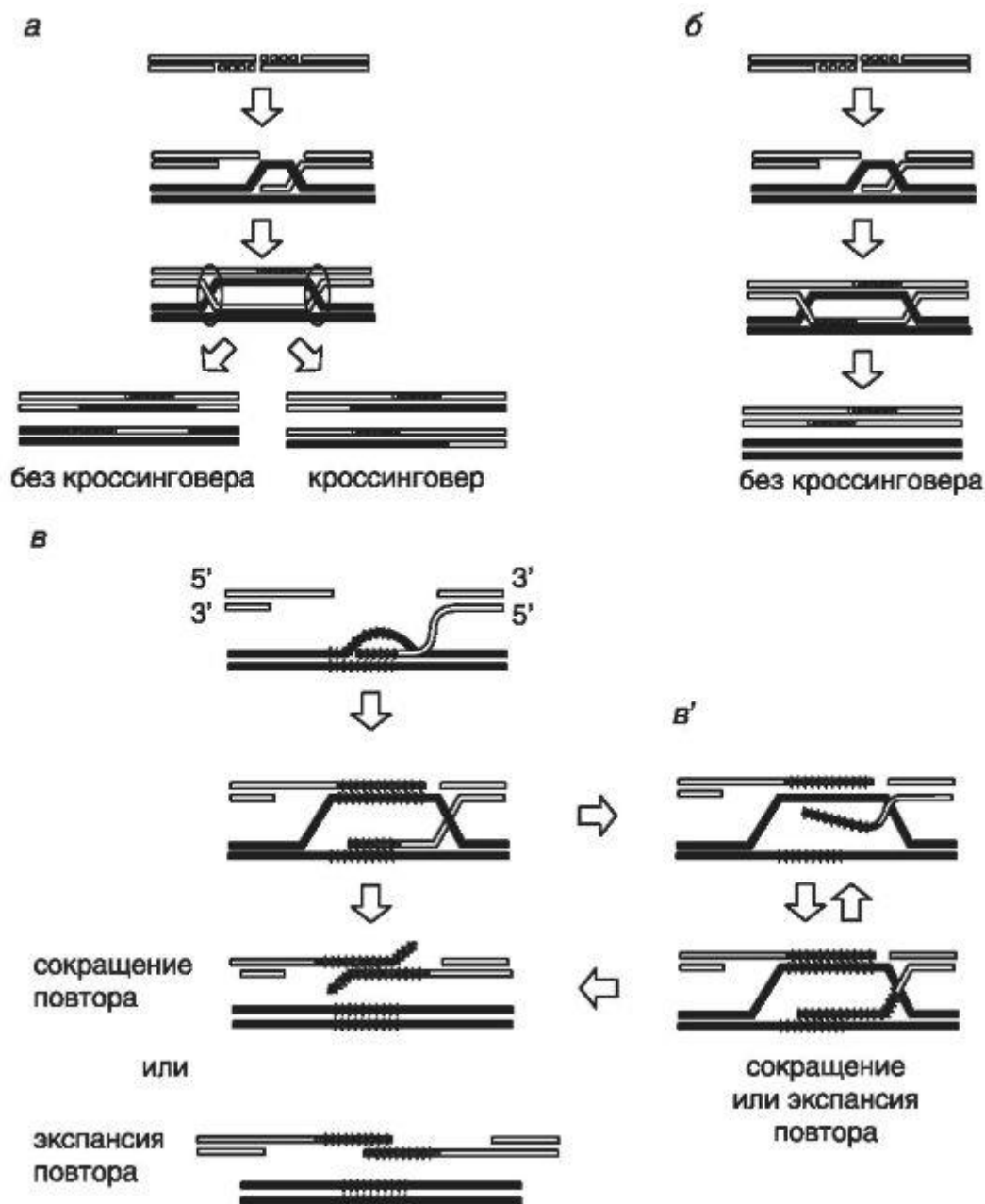


Рис.

74. Модели генной конверсии, инициированной двухнитевыми разрывами ДНК (по Cummings C.J. and Zoghbi H.Y., 2000).

Стрелки указывают направление синтеза ДНК в рамках репарации двухнитевых разрывов. Поврежденная молекула ДНК выделена белым цветом. Матричная цепь ДНК выделена черным цветом. Дочерняя вновь синтезированная цепь ДНК имеет серый цвет. Области tandemных повторов обозначены вертикальными линиями.

Модель а демонстрирует разрешение двух четырехнитевых структур (структуры Холидея) - они обведены кругами. Модель а ведет к генной конверсии, ассоциированной с кроссинговером в 50% случаев. Модель б - синтеззависимый отжиг цепей ДНК. Модель в - перестройки tandemных повторов по модели б. Модель в' - отделение вновь синтезированной цепи и ее повторный ошибочный отжиг на матрице

Белл (ген FRAXA) или УО, сцепленной с ломкой X-хромосомой (ген FRAXE). Патогенез этих заболеваний связан либо с выключением экспрессии гена в результате инактивации его промоторной области (гены FMR1 и FMR2), либо с нарушением (блокированием) транскрипции гена (гены DMPK и FRDA).

- Второй класс - болезни, обусловленные мутациями с эффектом «плюс». Такие мутации приводят к появлению токсических белков, повреждающих подкорковые структуры мозга - это все остальные болезни, не вошедшие в класс болезней с эффектом «минус». Их патогенез обусловлен увеличением длины полиглутаминового тракта (9 болезней, связанных с триплетом CAG, кодирующим глутаминовую кислоту) или увеличением длины полиаланинового тракта (одна болезнь). Следует отметить, что белки полиглутаминового тракта приобретают характеристики, напоминающие характеристики прионных белков (см. главу 29): они вызывают токсический эффект в нейронах подкорковых отделов мозга, что связано с апоптозом.

• Б. Классификация в зависимости от кодирующих и некодирующих повторов. В ее основу также положено деление БЭ на два класса.

- Первый класс - болезни, связанные с кодирующими повторами. Среди них 18 заболеваний, включая 9 нозологий, обусловленных полиглутаминовыми трактами: болезнь Кеннеди (Xq12), денторубропаллидолюисова атрофия (12p13.31), СЦА 6 типов: 1 (6p23), 2 (12q24.1), 3 (14q32.1), 6 (19p13), 7 (3p14.1) и 17 (6q27), хорея Гентингтона (4p16.3); а также 9 нозологий, обусловленных полиаланиновыми трактами: блефарофимоз и эпикант (3q23), врожденный синдром центральной гиповентиляции (4p12), клайдокранияльная дисплазия (6p21), семейная алобарная голопрозэнцефалия (13q32), околофарингеальная мышечная дистрофия (14q11), рука-нога-генитальный синдром (17p15), синполидактилия (2q31), X-сцепленная УО в сочетании с дефицитом гормона роста (Xq26.3), X-сцепленная УО в сочетании с эпилепсией (Xp22.13);

- Второй класс - болезни, связанные с некодирующими (микросателлитными) повторами. Среди них 9 заболеваний: атаксия Фридрейха (9q13), миотоническая дистрофия, тип 1 (19q13.3) и тип 2 (3q21), синдром Мартина-Белл или УО FRAXA (Xq27.3),

УМО FRAXE (Xq28), прогрессирующая миоклонус-эпилепсия (21q22.3), СЦА трех типов: 8 (13q21), 10 (22q13) и 12 (5q31-33).

• В. Классификация в зависимости от состава моноаминокислотного тракта. Эта классификация входит составной частью в первый класс из 18 болезней классификации Б, включая 9 болезней полиглутаминового и 9 болезней полиаланинового трактов (нозологии приведены выше).

• Г. Классификация в зависимости от локализации копий повторов в транслируемой и нетранслируемой областях генов. В первом случае экспансия колеблется в пределах 40-80 копий повторов, нарушения транскрипции и трансляции мутантных генов отсутствуют, и БЭ возникают в результате неправильного функционирования протяженных трактов. Для таких болезней характерна поздняя манифестация с неуклонным прогрессированием (например, хорея Гентингтона и разные типы СЦА). Во втором случае экспансия достигает больших значений и колеблется от нескольких сотен до нескольких тысяч копий повторов. При таких болезнях характер клинических проявлений и темп прогрессирования тесно связаны с неправильным функционированием протяженных трактов, ибо большое число копий нуклеотидных повторов делает ген нестабильным, приводя к феномену антиципации в семейных родословных.

К этому классу принадлежат: атаксия Фридрейха, миотоническая дистрофия и синдром Мартина-Белл.

БОЛЕЗНИ ЭКСПАНСИИ КОДИРУЮЩИХ ПОВТОРОВ

В табл. 17 приведены 18 таких заболеваний, относящихся к классификации Б.

Таблица 17. Характеристика болезней экспансии кодирующих повторов

Нозология	Локус	Ген	Кодируемый белок	Тип повтора	Размер повтора	
					норма	патология
Блефаро-фимоз и эпикант	3q23	FOXL2	—	GCG	10–14	15–30
Болезнь Кеннеди	Xq13-21	AR	Андрогеновый рецептор	CAG	9–36	38–62

Денторубро-паллидо-люйисова атрофия	12p13.31	DRPLA	Атрофин 1	CAG	6–35	49–88
Клайдо-краниальная дисплазия	6p21	RUNX2	—	GCA или GCT	15	17–27
Окуло-фарингеальная мышечная дистрофия	14q11	PABPN1	PABP2—	GCG	6	7–13
Рука-нога-генитальный синдром	17p15	NOXA13	—	GCA	15–16	18–26
Семейная алобарная голопроэнцефалия	13q32	ZIC2	—	GCA или GCT	10–14	15–25
Синдром врожденной центральной гиповентиляции	4p12	PNOX2B	—	GCG	24	25–29
СПА, тип 1	6p23	SCA1	Атаксин 1	CAG	6–44	39–82
СПА, тип 2	12q24.1	SCA2	Атаксин 2	CAG	15–31	36–63
СПА, тип 3	14q32.1	SCA3	Атаксин 3	CAG	12–40	55–84
СПА, тип 6	19p13	CACNL1A4	CACNA1A	CAG	4–18	21–33
СПА, тип 7	13p12-13	SCA7	Атаксин 7	CAG	4–35	37–306
СПА, тип 17	6q27	TBP	TBP	CAG	29–42	47–55
Синполидактилия	2q31	NOXD13	—	CAG	—	22–29
Х-спеленная УО с дефицитом гормона роста	Xq26.3	SOX3	—	CGG	10–14	15–26

Х-сцепленная УО с инфантильными спазмами	Xp22.13	ARX	—	GCG	до 10	12–23
Хорея Гентингтона	4p16.3	HG	Гентингтин	CAG	6–35	36–121

Примечание. Знак «-» обозначает отсутствие данных.

Таким образом, приведенные в этой таблице типы тринуклеотидных повторов кодируют либо белки увеличенного полиглутаминового тракта (CAG-повтор экспрессирует белки: гентингтин, атрофин, TBP и SACSNAIA, белки андрогенового рецептора и белки атаксинов 1-3 и 7), либо белки увеличенного полиаланинового тракта (повторы GCG, GCA и GCT).

При этом размеры кодирующего повтора CAG меньше, чем размеры некодирующего микросателлитного повтора GCG.

Причинно-следственные связи

В случае БЭ, связанных с полиглутаминовыми трактами, гомология между белками, содержащими такие тракты, отсутствует, хотя они объединены общим механизмом экспансии на основе кодирующего повтора CAG. Для этих заболеваний характерна прогрессирующая дисфункция нейронов, развивающаяся у больных обычно в зрелом возрасте и приводящая к выраженной дегенерации нервных клеток. И хотя при БЭ поражаются практически все ткани организма, дегенерации подвержена лишь небольшая группа нейронов, специфическая для каждой нозологии.

По-видимому, патогенез болезней, связанных с полиглутаминовым и полиаланиновым трактами, заключается в приобретении белками с протяженными трактами функций цитотоксичности при их агрегации между собой или другими белками - именно этим определяется общность внутриклеточных эффектов мутантных белков (см. выше).

Например, в случае полиглутаминовых трактов основной патогенетический механизм заключается в том, что трансглутаминаза связывает полиглутаминовый тракт с полипептидами, содержащими лизиловые группы, что ведет к формированию кополимеров с цитотоксическим действием.

С другой стороны, антипараллельные бета-цепи полиглутаминовых повторов удерживаются вместе водородными связями, что ведет к их мультимеризации и последующей агрегации молекул. Иными словами, образование токсических агрегатов не является необходимым условием для развития БЭ, что нашло подтверждение у больных с синдромом Кеннеди, СЦА типов 2 и 7 и хореей Гентингтона при обнаружении у них белковых агрегатов не только в селективно поврежденных нейронах, но и в неповрежденных клетках других тканей. Эта причина цитотоксичности была подтверждена для всех БЭ.

События, сопутствующие механизму экспансии

Причины и механизмы формирования протяженных белковых агрегатов и их токсического действия можно представить как многозвеньевую цепочку метаболических событий в клетке, в которой *первое звено* - это экспансия полиглутаминового или полиаланинового трактов; *второе звено* - это изменение пространственной организации патологических белковых молекул; *третье звено* - это устойчивость патологических

белковых молекул к протеосомной утилизации; *четвертое звено* - это увеличение селективной дегенерации клеток, содержащих такие молекулы.

Следует отметить, что для третьего звена данной цепочки было показано, что патологические молекулы белка - атаксина 1 (92-глу) более устойчивы к убиквитин-опосредованной деградации *in vitro*, чем нормальные молекулы.

Помимо основных событий механизма экспансии, в поврежденной клетке наблюдается скопление протеосом и белков - молекулярных шаперонов, которые регулируют сборку пространственной структуры патологического белка и уменьшают его цитотоксичность, контролируя степень агрегации и скорость обмена с другими белками.

В качестве одного из патогенетических механизмов следует упомянуть внутриядерное накопление белковых агрегатов, которые изменяют экспрессию генов, аномально взаимодействуя с регуляторами транскрипции. Например, был выделен ТАТА-связывающий белок (ТВР), служащий причиной СЦА 17-го типа (см. ниже).

При хорее Гентингтона выделен белок - гентингтин, который в норме (когда нет молекул экспансии) не взаимодействует с репрессором транскрипции (N-COR). При появлении молекул экспансии гентингтин связывается с ними, повреждая аппарат транскрипции.

В нейронах у таких больных выявлена эктопическая цитоплазматическая локализация N-CoR и одного из его корепрессоров - Sin3a.

Кроме этих белков, при БЭ обнаружены транскрипционные факторы: CBP, TAFII130 (один из ТВР-ассоциированных факторов). Все это указывает на серьезные повреждения транскрипции вследствие экспансии патологических белковых трактов.

Наконец, следует отметить участие каспаз, ибо при БЭ, связанных с полиглутаминовыми трактами, им принадлежит особая роль - эти ферменты (цистеиновые протеазы) участвуют в апоптозе (см. главу 11).

Болезни экспансии, связанные с полиглутаминовыми трактами

Следует отметить, что полный клинический спектр последствий экспансии полиглутаминового тракта в специфических нейробелках остается пока неизвестным.

Болезнь Кеннеди

Болезнь Кеннеди или рецессивная сцепленная с полом спинобульбарная мышечная атрофия, манифестирует после 40 лет. Характерны поражение бульбарной группы черепных нервов и нисходящие параличи. Периферические парезы начинаются с проксимальных отделов верхних конечностей и мускулатуры надплечий. Снижение мышечной силы сопровождается атрофиями мышц и выраженными фасцикуляциями. Вначале угнетаются рефлексы с двуглавой и трехглавой мышц, затем появляется тремор пальцев. В дальнейшем присоединяется слабость в проксимальных группах мышц нижних конечностей с угнетением коленных и ахилловых рефлексов. Страдают мимическая мускулатура и мышцы, иннервируемые бульбарной группой черепных нервов, что ведет к дисфагии и дизартрии. Описаны эндокринные нарушения в виде гинекомастии.

Ген болезни локализован в X-хромосоме (Xq13-21), кодирует андрогеновый рецептор AR.

Болезнь проявляется при количестве копий повтора CAG, равном 38-62. При позднем дебюте и мягких клинических проявлениях число копий этого повтора обычно не превышает 40.

Денторубропаллидольюисова атрофия

Денторубропаллидольюисова атрофия впервые описана в 1982 г. в Японии в пяти семьях. Распространенность заболевания в Японии

составляет 4 случая на 1 млн человек. В других странах описано 7 семей неапонского происхождения с подобным заболеванием. Болезнь дебютирует после 20 лет. Смерть наступает после 40 лет.

Симптоматика характеризуется миоклонус-эпилепсией, атаксией, хореоатетозом и деменцией. При морфологических исследованиях обнаруживается дегенерация денторубральной и паллидольюисовой систем. Феномен антиципации наблюдается только при получении мутантного аллеля от отца. У всех больных наблюдается четкая корреляция между возрастом начала болезни и величиной экспансии повтора CAG.

Пациенты с более ранним дебютом и быстро прогрессирующей миоклонус-эпилепсией имеют большую протяженность области повтора. Характерным является расширение этой области в среднем на 4 повтора при прохождении мутантного аллеля через сперматогенез и сохранение или даже уменьшение длины повтора при получении мутации от матери.

Доказана аллельная природа этой болезни и сходного с ней синдрома Хау-Ривера, описанного в 1989 г. в нескольких афроамериканских семьях. Оба заболевания манифестируют в возрасте 15-30 лет с проявления атаксии, эпилептических припадков, хореоформных гиперкинезов и прогрессирующей деменции. Часто развивается шизофреноподобная симптоматика.

При морфологическом исследовании выявляется дегенерация нейронов зубчатого ядра, микрокальцификация бледного шара, нейроаксональная дистрофия *nucleus gracilis* и демиелинизация *centrum semiovale*.

Ген болезни DRPLA локализован в хромосоме 12 (12p13.31), он кодирует белок - атрофин 1. Болезнь проявляется при наличии 40-88 копий повтора CAG.

Спиноцеребеллярные атаксии

В основе этой группы заболеваний лежат прогрессирующие дегенеративные изменения в нейронах мозжечка, головного мозга и спиноцеребеллярном тракте. Характеризуются атаксией, дизартрией, офтальмоплегией. СЦА дебютируют с изменения походки, затем появляются изменения в руках (дизметрия, интенционный тремор). Постепенно нарастает мышечная слабость (сначала в ногах), которая сопровождается повышением тонуса и глубоких рефлексов. Появляются мозжечковая дизартрия, офтальмопарез, птоз и тотальная офтальмоплегия (с отсутствием зрачковых реакций на свет). Часто выявляются нарушение памяти и снижение критики.

Спиноцеребеллярная атаксия, типы 1 и 2

СЦА, тип 1 (оливопонтocereбеллярная атаксия), или болезнь Менделя, а также СЦА, тип 2, имеют сходную симптоматику.

Оба заболевания начинаются в третьем-четвертом десятилетии жизни с появления легкого нарушения походки и неловкости при быстрой ходьбе и беге. По мере прогрессирования болезни развиваются мозжечковая атактическая походка, интенционный тремор, неустойчивость в позе Ромберга, асинергия мимической мускулатуры с мозжечковым гримасничаньем.

Расстройства речи возникают рано и носят сложный мозжечководизартрический характер.

Характерны экстрапирамидные нарушения в виде разнообразных гиперкинезов: статокINETический тремор конечностей, туловища и головы, миоклонии, кривошея, хореоформные, атетоидные, дистонические гипердвижения. Реже встречается синдром паркинсонизма.

На первом-втором годах от начала заболевания наблюдаются: глазодвигательные расстройства, нистагм, нарушения глотания и фонации, расстройства сфинктеров, пирамидная симптоматика разной степени выраженности, спинальные симптомы (амиотрофии, фасцикуляции, арефлексия, нарушения глубокой чувствительности), деменция. В отдельных семьях отмечены атрофия зрительных нервов, дегенерация сетчатки, катаракта.

Иногда зрительные нарушения могут стать началом манифестации болезни и на много лет опередить появление неврологической симптоматики.

Продолжительность жизни больных от момента манифестации не превышает 10-15 лет. Причина смерти - инфекционные осложнения.

Основные критерии клинического диагноза: дебют в возрасте 30-40 лет; мозжечковая атаксия, дизартрия, экстрапирамидные симптомы (тремор, миоклонии, торсионно-дистонические гиперкинезы), глазодвигательные нарушения, дисфагия и дисфония, расстройства сфинктеров, деменция; неуклонное прогрессирование в течение всей болезни.

При КТ мозга наблюдается истончение средней ножки мозжечка, расширение субарахноидального пространства полушарий и червя мозжечка, расширение большой цистерны, 4-го желудочка, боковых желудочков и субарахноидального пространства больших полушарий мозга. При МРТ дополнительно визуализируются атрофия моста и

продолговатого мозга. В настоящее время возможна прямая ДНКдиагностика, основанная на идентификации:

- гена болезни SCA1 (кодирует белок - атаксин 1) в локусе хромосомы 6 (6p22-23); болезнь проявляется при экспансии повтора CAG, равной 39-82 копиям;
- гена болезни SCA2 (кодирует белок - атаксин 2) в локусе хромосомы 12 (12q24.1); болезнь проявляется при экспансии повтора CAG, равной 36-64 копиям.

Спиноцеребеллярная атаксия, тип 3

СЦА, тип 3, или болезнь Мачадо-Джозефа, впервые описана в 70 годах XX в. в семьях португальского происхождения.

Дебютирует в возрасте от 20 до 60 лет. Выделяют четыре патологических фенотипа: первый проявляется преимущественно экстрапирамидными и пирамидными симптомами; второй характеризуется сочетанием мозжечковой атаксии, пирамидных и экстрапирамидных симптомов; третий - сочетание мозжечковой симптоматики и амиотрофии; четвертый - сочетание синдрома паркинсонизма с легкой мозжечковой симптоматикой, дистальной мотосенсорной невропатией и амиотрофией.

Выделяют основные и дополнительные (малые) диагностические критерии. К основным критериям относятся: мозжечковая атаксия, пирамидная симптоматика разной степени выраженности, периферические амиотрофии, экстрапирамидные расстройства (мышечная дистония, синдром паркинсонизма). К малым критериям относятся: прогрессирующая наружная офтальмоплегия, подергивание мышц лица и языка при целенаправленных движениях (напоминают крупные фасцикуляции), «выпученные глаза» или широко

раскрытые глазные щели с неподвижными, фиксированными глазными яблоками (обусловлено офтальмоплегией и ретракцией верхних век).

Продолжительность заболевания около 20 лет. Больные умирают от инфекционных осложнений.

При КТ и МРТ мозга наблюдается выраженное расширение 4-го желудочка и относительная сохранность коры полушарий, червя мозжечка и варолиева моста (даже при многолетнем течении болезни).

Ген болезни локализован на хромосоме 14 (14q32.1), кодирует белок-атаксин. Болезнь проявляется при наличии 55-84 копий повтора CAG.

Спиноцеребеллярная атаксия, тип 6

СЦА, тип 6, или наследственная пароксизмальная церебелляр-

ная атаксия, в одних случаях сочетается с эпизодической атаксией, а в других случаях - с семейной гемиплегической мигренью. Заболевание характеризуется поздним дебютом, мягким течением и медленным прогрессированием (длится 20-30 лет).

Клиническая симптоматика включает: мозжечковую атаксию, нистагм, скандированную речь, легкое снижение вибрационной и проприоцептивной чувствительности. Постепенно пациенты утрачивают способность к самостоятельному передвижению, позднее у них развивается парез гортани.

При МРТ мозга обнаруживается атрофия мозжечка и спинного мозга. При морфологическом исследовании - значительная потеря клеток Пуркинье и (в меньшей степени) гранулярных клеток, нейронов зубчатого ядра и нижних олив.

При этом заболевании наблюдается достоверно значимая обратная корреляция между возрастом начала болезни и величиной экспансии повтора CAG. Вместе с тем, в отличие от других БЭ здесь нет прямой связи между дополнительной экспансией мутантного аллеля и феноменом антиципации.

Ген болезни CACNL1A4 локализован в хромосоме 19 (19p13); он кодирует белок CACNA1A.

Болезнь проявляется при наличии 21-33 копий повтора CAG. В этой же области хромосомы 19 (19p13) картированы еще два гена, связанных с семейными нейродегенеративными нарушениями. *Первый ген* отвечает за развитие наследственной пароксизмальной церебеллярной атаксии (НРСА) или эпизодической атаксии (ЕА), характеризующейся нистагмом и периодическими приступами атаксии, продолжающимися от нескольких минут до нескольких часов (иногда дней).

Причем в перерывах между приступами сохраняется нормальная координация.

Частота и тяжесть приступов с возрастом уменьшаются. Приступы могут быть связаны с эмоциональным стрессом, приемом алкоголя, гипоксией и другими причинами.

При появлении симптомов атаксии часто развивается негемиплегическая мигрень.

При МРТ мозга обнаруживаются признаки церебеллярной атрофии.

Второй ген связан с семейной гемиплегической мигренью (FHM), при которой у пациентов с раннего детского возраста развиваются периодические приступы односторонней пульсирующей головной

боли. В некоторых семьях наблюдаются дегенеративные изменения мозжечка, клинически проявляющиеся атаксией, нистагмом, вестибулярными нарушениями, сходными с таковыми при НРСА/ ЕА. Перекрывание симптомов этих двух заболеваний позволило высказать предположение об их аллельной природе, а периодичность приступов указывала на возможность дефекта гена, кодирующего один из ионных каналов клетки.

В некоторых семьях у родственников больных наблюдалось перекрывание симптомов, характерных для всех трех приведенных выше форм заболеваний. Например, в одной из семей с диагнозом «эпизодическая атаксия» симптомы заболевания у разных пациентов варьировали от изолированного нистагма до тяжелой прогрессирующейocerebellарной атаксии. При этом обнаружилась экспансия повтора CAG в мутантном аллеле гена, где было 23 копии триплета, однако точковые мутации в кодирующей области гена CACNL1A4 отсутствовали. У другой семьи мутантный аллель CAG25 оказался связан с прогрессирующей cerebellарной атаксией, а аллель CAG20 ассоциирован с эпизодической атаксией.

В настоящее время считается, что небольшие экспансии CAG- повтора в гене CACNL1A4 являются мейотически нестабильными, и их мутации могут объяснить варьирующий полиморфизм признаков болезни у родственников из одной и той же семейной родословной.

Спиноцереbellарная атаксия, тип 7

СЦА, тип 7 характеризуется сочетанием мозжечковой атаксии и прогрессирующей пигментной дегенерации сетчатки. В дальнейшем возможно развитие дисфагии вследствие констрикторных расстройств. Возраст начала болезни варьирует от 1,5 до 70 лет. Характерна антиципация, особенно выраженная при получении мутантного аллеля от отца. В этом случае болезнь дебютирует на 20 лет раньше в каждом последующем поколении. Но анализ характера наследования этого заболевания часто осложняется получением больными мутантного аллеля от матери, что указывает на возможность селективного отбора, направленного против аллелей, проявляющихся большой экспансией, которая происходит на уровне зародышевых клеток или ранних зародышей.

При длине CAG-повторов более 59 копий болезнь дебютирует с ухудшения зрения, тогда как при меньших значениях количества копий CAG-повторов первым симптомом является атаксия.

Спиноцереbellарная атаксия, тип 17

СЦА, тип 17 - это аутосомно-доминантная форма с хорошо

изученным патогенезом. В ее основе лежит механизм аномального взаимодействия проникших в клеточное ядро молекул, содержащих протяженные полиглутаминовые тракты, с регуляторами транскрипции, что нарушает экспрессию генов. Причина - белок ТВР, являющийся субъединицей транскрипционного фактора D, входящего в состав белкового комплекса РНК-полимеразы II (TFIID), который необходим для экспрессии большинства генов.

Как известно, РНК-полимераза II участвует в синтезе РНК на матрице ДНК, но самостоятельно она не способна узнавать промоторные области генов. Для этого существуют факторы транскрипции, последовательно связывающиеся с промотором и образующие ОИК, кэп-сайт (см. главу 3). При данном заболевании первым в этом комплексе стоит TFIID, сформированный из белка ТВР. В N-концевой области молекулы данного белка расположен протяженный полиглутаминовый повтор, определяющий ДНК-связывающую активность С-концевой области молекулы.

ТВР-белок в комплексе с ТАТА-боксом приобретает специфическую пространственную структуру (седловидную форму), в которой вогнутая внутренняя часть контактирует с ДНК, а внешняя выпуклая часть - с субъединицами комплекса TFIID, которые являются ТВР-ассоциированными факторами транскрипции. Нарушения нормальной пространственной структуры ТВР изменяют аффинность ТВР-ассоциированных факторов, что ведет к нарушениям экспрессии генов и клеточной гибели.

Хорея Гентингтона

Хорея Гентингтона известна с 1872 г. Она относится к тяжелой нейродегенеративной патологии, наследуемой по аутосомнодоминантному типу с полной пенетрантностью. Ген болезни локализован в хромосоме 4 (4p16.3). Он кодирует белок - гентингтин, аномально взаимодействующий с транскрипционными факторами при его проникновении в клеточное ядро. В норме молекулы гентингтина не вступают во взаимодействие с репрессором транскрипции N-CoR, в то время как молекулы белка с экспансией полиглутаминового тракта связывают этот репрессор. Болезнь проявляется при количестве копий повтора CAG, равном 36-121. Клинические признаки включают триаду симптомов: гиперкинезы, деменция, психические расстройства. Выделяют гиперкинетический (90% случаев) и кинетикоригидный (10%) варианты болезни. Первый вариант характеризуется нарастающими гиперкинезами, манифестацией

заболевания в четвертом-пятом десятилетиях жизни и заканчивается смертью через 15-20 лет после появления первых признаков. Второй вариант (болезнь Вестфала) возникает в первом-втором десятилетиях жизни, проявляется мышечной ригидностью, контрактурами, тремором рук, атаксией, миоклонией, пирамидными симптомами, но гиперкинезов при этом нет. Наследственная передача в этом случае идет исключительно по линии отец-сын.

Болезни экспансии, связанные с полиаланиновыми трактами

Блефарофимоз и эпикант

Блефарофимоз и эпикант в сочетании с другими глазными аномалиями (короткая и узкая глазная щель, неправильный рост ресниц, микрокорнея, миопия высокой степени и иногда - микрофтальмия, ювенильная катаракта) - это редкое заболевание с аутосомнорецессивным типом наследования. Ген болезни FOXL2 локализован в хромосоме 3(3q23). Он обуславливает развитие патологического фенотипа при количестве копий повтора GCG, равном 15-30.

Клайдокраниальная дисплазия

Клайдокраниальная дисплазия (черепно-ключичный дизостоз) известна с 1897 г.

Минимальные диагностические признаки: аплазия ключицы или ее части, поздние: закрытие родничков, оксификация черепных швов и прорезывание зубов.

Клинически синдром представляет собой генерализованную скелетную дисплазию. Это длительно незакрывающиеся (открытые) черепные швы и роднички, что ведет к чрезмерному развитию лобных, височных и затылочных бугров, наличию вормиевых костей.

Созревание скелета замедлено. Отмечается отставание в росте. Характерны: укорочение средних фаланг 5 пальца кисти, дополнительные эпифизы 2 и 5 метакарпальных костей, широкое лонное сочленение, аномалии позвонков и ребер, сколиоз, узкая грудная клетка, повышенная ломкость костей. Патология зубов включает гипоплазию эмали и кариес.

Описаны глухота, расщелина нёба и синингомелия.

Ген болезни RUNX2 локализован в хромосоме 6 (6p21). Болезнь проявляется при 17-27 копиях повторов GCA и GCT.

Окулофарингеальная мышечная дистрофия

ОФМД обусловлена кодирующим повтором GCG с изменяю-

щейся длиной. Это легкая по течению форма заболевания. Она выявляется у гетерозигот, но у них, как правило, отсутствуют выраженные клинические проявления, что можно объяснить состоянием премутации, ибо количество GCG-повторов не превышает 6 (соответствует нормальному значению). В случаях, когда число повторов GCG увеличивается от 7 до 13 копий, наблюдается возрастание протяженности полиаланинового тракта, расположенного в N-конце поли (А)-связывающего белка РАВР2, что обуславливает развитие тяжелой доминантной формы заболевания, которая начинает проявляться уже при экспансии, равной семи повторам. Частота аллеля (GCG)₇ в нормальной популяции не превышает 2%. У гетерозигот (GCG)₆ / (GCG)₇ нет признаков ОФМД, тогда как у гомозигот (GCG)₇ / (GCG)₇ развивается аутосомно-рецессивная форма болезни.

Таким образом, аллель GCG₇ выступает в роли модификатора как доминантно, так и рецессивно наследуемых патологических фенотипов.

Рука-нога-генитальный синдром

Рука-нога-генитальный синдром развивается у женщин, наследуется по аутосомно-доминантному типу. Патологический фенотип включает комплекс врожденных нарушений развития: аномалии кистей (клинодактилия мизинца, укорочение метакarpальных костей, дислокация большого пальца; аномалии стоп (маленькие размеры, большой палец меньше других вследствие укорочения метатарзальной кости); аномалии внутренних половых органов (удвоение тела или шейки матки, перегородки влагалища).

Ген болезни NOXA13 локализован в хромосоме 17 (17p15). Он обуславливает развитие заболевания при количестве копий повтора GCA, равном 18-26.

Семейная алобарная голопрозэнцефалия

Семейная алобарная голопрозэнцефалия или аринэнцефалия встречается с частотой 1:16 тыс. человек, характеризуется аутосомно-рецессивным типом наследования. Дети нежизнеспособны. Наблюдаются неразделение конечного мозга на сферы, двусторонние расщелины губы и нёба, отсутствие фильтра, гипотелоризма. В тяжелых случаях выявляются цебоцефалия и циклопия. На рентгенограмме: отсутствие мозолистого тела, единая вентрикулярная полость, свободно сообщающаяся с субарахноидальным пространством. Другие морфологические изменения: отсутствие обонятельных луковиц, обонятельного тракта и пластинок, гипоплазия гиппокампа; крупные извилины, деформация передней черепной ямки.

Ген болезни ZIC2 локализован в хромосоме 13 (13q32). Болезнь проявляется при 15-25 копиях повторов GCA и GCT.

Синдром врожденной центральной гиповентиляции

СВЦГ проявляется в виде альвеолярной гиповентиляции и врожденной гиповентиляции. Первая форма редко диагностируется, проявляется как апноэ во время сна, характеризуется снижением насыщения крови кислородом при сохранности двигательной

(механической) функции легких. Объясняется нарушением чувствительности рецепторов к кислороду и углекислоте.

При этой форме выделяют первичный (идиопатический) тип и вторичный тип - результат неврологического поражения. Основными жалобами являются: частые пробуждения, ощущение невысыпания и головные боли по утрам. Лечение разработано недостаточно.

Вторая форма - еще более редкое состояние. Это наблюдаемые с первых месяцев жизни нарушения легочной вентиляции; проявляются во время сна. С возрастом у больных детей происходит постепенное «дозревание» хеморецепторных систем, и считается, что с 4-5 лет такие больные уже не требуют обязательной госпитализации в случае респираторной инфекции. Эта форма центральной гиповентиляции нередко сопровождает другие наследственные болезни (болезнь Гиршпрунга, нейробластома). Ген PNOX2B локализован в локусе 4p12. Болезнь проявляется при количестве копий повтора GCG, равном 25-29.

Синполидактилия

Синполидактилия - это синдром полидактилии (лишние пальцы), сочетающийся с синдактилией (сросшиеся пальцы). Встречается чаще других аномалий развития пальцев. Количество лишних пальцев - от одного (шестипалость) до трех (восьмипалость) и даже пяти (десятипалость). Добавочные пальцы имеют либо все элементы фаланг, либо только их часть; обычно они прикрепляются по краям кисти и стопы либо в области II-IV пальцев. У больных часто выявляются другие БАР и МАР.

Ген болезни NOXD13 локализован в хромосоме 2 (2q31). Развитие патологического фенотипа - при количестве копий повтора CAG, равном 22-29.

Х-сцепленная умственная отсталость в сочетании с дефицитом гормона роста

Х-сцепленная УО в сочетании с дефицитом гормона роста описана Н. Renpenning в 1953 г. Болезнь характеризуется тяжелой УО, микроцефалией, скошенным лбом, маленькими яичками, пре- и постнатальной задержкой роста (вследствие дефицита СТГ).

Ген болезни SOX3 локализован в Х-хромосоме (Xq26.3), его патологическое действие проявляется при количестве копий повтора GGG, равном 15-26.

Х-сцепленная умственная отсталость в сочетании с инфантильными спазмами

Х-сцепленная УО в сочетании с инфантильными спазмами - синдром, описанный в 1891 г. Ч. Вестом. Это заболевание детского возраста встречается с частотой 1:4,5-10 тыс. человек. Болеют преимущественно мальчики (60% случаев). Характерны: кратковременные серии пароксизмов с вовлечением сгибательных групп мышц (аксиальных), прогрессирующее нарушение психоневрологических функций и резистентность к терапии. Могут выявляться как криптогенные, так и симптоматические инфантильные спазмы, в том числе при первом типе спазмов отсутствует четкая причина болезни, наблюдается нормальное нервное и психическое развитие ребенка; до начала манифестации спазмов нет других типов приступов; не обнаруживается симптоматика при КТ и МРТ мозга.

При втором типе спазмов этиология известна. Это могут быть: хромосомный синдром, ВПР мозга, дисгенезии мозга, нейрокожные синдромы, НБО, а также неспецифические пренатальные повреждения мозга, связанные с патологией беременности, перинатальные гипоксические (ишемические) поражения мозга, травмы, опухоли и постнатальные

инфекции. Характерна задержка нервно-психического развития до начала приступов, нередко признаки поражения, выявляемые при КТ и МРТ мозга.

Ген болезни ARX локализован в локусе Xp22.13. Патологический фенотип проявляется при количестве повторов GCG, равном 12-23 копиям.

Следует отметить, что с геном ARX могут ассоциироваться и другие болезни: неспецифическая УО при инсерции GCG 2 и мутации гуанина G286S (856 G >A); УО при делеции: 429 del 24; лиссэнцефалия (420- 451 del 32); УО при синдромах Веста и Партингтона (429-452 del 24).

БОЛЕЗНИ ЭКСПАНСИИ НЕКОДИРУЮЩИХ ПОВТОРОВ

В таблице 18 приведены 9 БЭ некодирующих (микросателлитных) повторов.

Таблица 18. Характеристика болезней экспансии некодирующих (микросателлитных) повторов

Нозология	Локус	Ген	Кодируемый белок	Тип повтора	Размер повтора	
					норма	патология
Атаксия Фридрейха	Xq13-21.1	X25	Фратаксин	GAA	7–34	>100
Миотоническая дистрофия, тип 1	19q13.3	DMPK	DMPK	CTG	5–37	>50
Миотоническая дистрофия, тип 2	3q21	ZNF9	ZNF9	CCUG	<26	75–11000
Прогрессирующая миоклонус-эпилепсия	—	CSTB	CSTB	(C)4G(C)4 GCG (12 нуклеотидов)	2–17	30–75
Синдром Мартина–Белл (FRAXA)	Xq27.3	FMR1	FMRP	CGG	6–53	>230
Синдром УО FRAXE	Xq27.3	FMR2	FMR2	CGG	6–35	>200
Синдром УО (FRAXF)	Xq28	FMR3	FMR3	GCC	6–35	>200
СПА, тип 8	13q21	SCA8	—	CTG	16–37	110–250
СПА, тип 10	22q13	SCA10	SCA10	ATTCT	10–22	<4500
СПА, тип 12	5q31-33	SCA12	PP2A или PR55b	CAG	7–28	66–78

Примечание. Знак «-» обозначает отсутствие данных.

Все указанные в этой таблице болезни обусловлены значительным увеличением размеров микросателлитных повторов. Они, как большинство БЭ кодирующих повторов, сопровождаются дегенерацией и дисфункцией разных тканей и органов и выраженностью

клинических проявлений. При этом, несмотря на ряд общих свойств, некодирующие микросателлитные повторы различаются по нуклеотидному составу и расположению относительно кодирующих и регуляторных элементов генома, что обуславливает

упомянутую выше уникальность патогенетических механизмов при каждом конкретном заболевании.

В последние годы было показано, что некодирующие микросателлитные повторы, как правило, происходят из небольшого пула повторов промежуточных размеров.

Атаксия Фридрейха

Атаксия Фридрейха - это редкая БЭ, наследуемая по аутосомнорецессивному типу, при которой нет феномена антиципации. Клиника: атаксия, дизартрия, снижение рефлексов, кардиомиопатия, сахарный диабет. Морфологически выявляется дегенерация нейронов спинного мозга, ганглиев дорсальных корешков и сенсорных ганглиев. Причина - экспансия повтора GAA (мутация в гене фратаксина), ведущая к снижению его экспрессии и появлению протяженного повтора, богатого АТ-парами, затрудняющими транскрипцию. В результате в митохондриях накапливаются ионы железа, истощается мтДНК (феномен деплеции), угнетаются клеточное дыхание и работа железосерозависимых ферментов, что вызывает повышенную чувствительность к окислительному стрессу (см. главу 26).

Миотоническая дистрофия

Миотоническая дистрофия, тип 1

МД, тип 1 - это аутосомно-доминантное заболевание с мультисистемными проявлениями: катаракта, миотония, мышечная дистрофия, нарушение проводимости миокарда, эндокринные расстройства. При врожденной форме МД 1 наблюдаются множественные ВПР, гипотония, респираторный дистресс-синдром и УО.

Болезнь обусловлена мутациями в гене, локализованном в 19q13, и развивается в результате экспансии копий повтора CTG, который может одновременно присутствовать в 3'-нетранслируемой области гена протеинкиназы DMPK и промоторной области гена на хромосоме 19. Экспансия повтора CTG воздействует на уровень фермента DMPK, нарушая транскрипцию гена, процессинг и трансляцию

мРНК.

Внутри ядра накапливается мРНК с протяженным повтором CUS; она не попадает в цитоплазму, и поэтому изменяется внутриклеточ-

ная концентрация фермента DMPK, что ведет к аномальному фосфорилированию субстрата для этого фермента.

В последние годы выделены два гена, фланкирующих ген DMPK. Предполагается, что экспансия повтора CTG влияет на структуру хроматина и изменяет экспрессию близлежащих двух генов: гена DMAHP (в пределах его промоторной области расположен повтор CTG) и гена DMWD (расположен проксимально от гена DMPK, но вблизи от него). Полагают, что изменение функционирования этих двух генов может быть причиной МД 1.

Еще один механизм - это приобретение новой функции первичным транскриптом, имеющим протяженный тракт CUS (см. выше), т.е. возможен трансдоминантный эффект, нарушающий процессинг разных типов РНК, что обуславливает блокирование РНКсвязывающих белков CUS-BP и разнообразие симптоматики.

В целом, можно выделить единый механизм МД 1 - это воздействие экспансии копий повтора CTG на свойства мРНК, кодируемой геном DMPK, и на экспрессию генов, расположенных вблизи этого повтора.

Миотоническая дистрофия, тип 2

МД, тип 2 - это гетерогенная болезнь, обусловленная тетра nukлеотидным повтором CCTG, который расположен в транскрибируемой, но не транслируемой области гена ZNF9. Этот повтор в норме содержит 26 нуклеотидов; при МД 2 его размеры составляют от 75 до 11 000 (среднее значение около 5000) нуклеотидов.

Экспансия указанного повтора вызывает (независимо от хромосомного окружения и функционирования генов в клетке) выраженные мультисистемные расстройства, т.е. она крайне патогенна. При этом нет никакой функциональной гомологии между белком ZNF9 и протеинкиназой DMPK. По-видимому, в случае МД 2 основной причиной служит способность молекул с экспансией повторов CCTG создавать вторичные структуры в виде двухнитевой РНК, препятствующей нормальному ферментному расщеплению молекул, их созреванию и выходу в цитоплазму, что обуславливает накопление РНК с экспансией и мультисистемные расстройства.

Прогрессирующая миоклонус-эпилепсия

Прогрессирующая миоклонус-эпилепсия - это аутосомнорецессивное заболевание с хроническим течением и сочетанием миоклонических гиперкинезов с эпилептическими приступами, что ведет к церебеллярной атаксии.

Большинство мутаций - это крупные двенадцатинуклеотидные повторы (C)⁴G(C)⁴GCG или CCCC GCCCGCG, расположенные в промоторной области гена CSTB. Причина болезни - мутация в гене цистатина В (CSTB), кодирующем фермент - ингибитор цистеиновых протеаз, что ведет к нарушению пространственной организации промоторных элементов и гиперметилированию. При этом экспансия увеличивает расстояние от сайта связывания активатора транскрипции до точки ее инициации, ограничивая пространственное взаимодействие активатора с другими элементами транскрипционного комплекса.

Как следствие этих событий, происходит избыточное связывание рецепторов транскрипции, нарушение синтеза соответствующих мРНК и белка, изменяется структура хроматина.

Ген болезни CSTB не локализован; он кодирует одноименный белок.

Болезнь проявляется при количестве повторов, (C)⁴G(C)⁴ GCG, равном 30-75 копиям.

Синдром Мартина-Белл

Синдром Мартина-Белл (СМБ) - синдром наследственной УО. Синонимы: синдром FRAXA, синдром X-ФРА, fra(X)-синдром. СМБ широко распространен в популяции: 0,3-1:1000 (мужчины); 0,2- 0,6:1000 (женщины); в среднем - 0,5-1:1000. Такая частота сопоставима только с частотой синдрома Дауна (1:550-650).

У нормальных индивидов в сегменте Xq 27 существуют микросателлитные последовательности ДНК (повторы), содержащие 2-5 пар оснований. В случае мутации в гене FMR1 происходит не привычная замена одного нуклеотида на другой, а увеличение числа копий этих повторов. Экспансия (свыше 230 копий) - это полная мутация, проявляющаяся на клиническом уровне симптоматикой СМБ, а на молекулярном уровне - аномальным метилированием CpG-островка промоторной области гена FMRI, ибо в его 5'-нетранслируемой области содержатся повторы CGG. Эти повторы препятствуют транскрипции, что ведет к отсутствию мРНК и белка FMRP, который относится к РНК-связывающим белкам, циркулирующим между ядром и цитоплазмой.

В цитоплазме белок FMRP формирует РНП-комплекс, связывающийся с рибосомами.

Возможно, в нейронах белок FMRP определяет внутриклеточное расположение и регулирует трансляцию специфических мРНК-

мишеней. По-видимому, полная мутация как причина наследственной УО - это нарушение синтеза белков, необходимых для образования и функционирования синаптических контактов.

Установлена генетическая гетерогенность данного синдрома. Помимо «классической» формы синдрома - FRAXA, обнаружена микроделеция гена FMR1 (без амплификации триплета CGG и аномального метилирования), выделены новые ломкие участки, обозначаемые как формы: FRAXE (тот же триплет CGG, локализация гена в том же сегменте Xq27.3, но дистальнее на 500 тысяч пар оснований от сайта FRAXA; состояние мутации - свыше 200 копий) и форма FRAXF (триплет GCC; локализация гена в сегменте Xq28 на 1-2 млн пар оснований дистальнее сайта FRAXE или ближе к теломере; состояние премутации - 12-26; состояние мутации - свыше 200 копий). Тип наследования СМБ не укладывается в критерии X-сцепленного рецессивного наследования. Основные клинические признаки: умеренная или глубокая УО с аутистическими расстройствами, мышечной гипотонией и гиперактивностью.

Выявляется черепно-лицевой дисморфизм: большие оттопыренные ушные раковины, прямоугольное лицо, периорбитальная гиперпигментация, высокий и выступающий лоб, тонкий длинный нос, высокое нёбо (часто выявляются подслизистые расщелины нёба или язычка), массивный подбородок, широкие кисти и стопы, макроорхизм, гиперпигментация мошонки. Также встречаются: гинекомастия, гипоспадия, высокая эластичность соединительной ткани (гиперподвижность межфаланговых, коленных и голеностопных суставов), ожирение, пролапс митрального клапана, плоскостопие, сколиоз.

Комбинация всех перечисленных признаков характерна для 50-60% больных мужчин.

Остальные больные мужчины не имеют дисморфизма лица (10%), еще часть мужчин (также 10%) имеют только УО, но без остальных признаков, а оставшиеся 20-30% мужчин не имеют макроорхизма. Клиническая диагностика СМБ сложна из-за недостаточной специфичности и широкой вариабельности симптомов. Даже наиболее специфический из них - макроорхизм - имеет диагностическую ценность только в пубертатном и постпубертатном периодах, а УО может быть симптомом многих других заболеваний.

Примерно половина больных мужчин - это трансмиттеры, или носители (передатчики) неэкспрессируемого мутантного гена, кото-

рый становится экспрессируемым при передаче последующим поколениям в одной семейной родословной.

Наряду с этим описаны два типа женщин - гетерозиготных носителей гена синдрома, в том числе: дочери нормальных мужчин-трансмиттеров, не имеющие клинических признаков и генетических нарушений, а также родные сестры больных мужчин-трансмиттеров, имеющие клинические признаки болезни в 35% случаев. Как оказалось, вероятность развития УО зависит от положения индивида в родословной. При этом четко наблюдается феномен антиципации - более раннее и тяжелое проявление симптомов заболевания в последующих поколениях родословной, или парадокс Шермана.

Умственная отсталость, ассоциированная с ломким участком X-хромосомы

Это второй вариант синдрома наследственной УМО, ассоциированной с ломким участком X-хромосомы, или синдром FRAXE. Частота в популяции - 1:50 тыс. человек (всего описано около 30 случаев). Основной симптом - задержка интеллектуального развития, задержка речи, развития навыков чтения и письма, рассеянное внимание, гиперактивность; редко наблюдается аутизм. В отличие от классического СМБ здесь нет черепно-лицевого дисморфизма. Характерна экспансия повтора GCC, локализованного в гене FMR2, который экспрессируется в гиппокампе. Эта мутация ассоциируется с аномальным метилированием (гиперметилированием) промоторной области гена FMR2, что ведет к подавлению транскрипции и отсутствию мРНК и белка.

Спиноцеребеллярные атаксии Тип 8

СЦА, тип 8 - это прогрессирующая атаксия с атрофией мозжечка и «оживленными» рефлексам. Причина - экспансия повтора CTG в 3'-терминальном экзоне гена SCA8, экспрессирующемся в тканях головного мозга. Транскрипт этого гена не транслируется и, возможно, служит эндогенной антисмысловой РНК, регулирующей экспрессию других генов. Кроме такой РНК, была выделена РНК, транскрибируемая в ориентации, обратной гену SCA8. Этот первичный транскрипт гомологичен продукту гена KELCH у дрозофилы. Его значение пока не определено.

Тип 10

СПА, тип 10 - это аутосомно-доминантное заболевание, обусловленное экспансией пентануклеотидного повтора ATTCT в интроне 9 гена SCA10.

В норме наблюдается 10-22 нуклеотида, тогда как у больных их число достигает 4500. Патогенез пока не известен.

Тип 12

ЦСА, тип 12 - это редкое заболевание с экспансией повтора CAG в 5'-нетранслируемой области гена PP2A или гена PP55b, кодирующего специфическую для нервной ткани регуляторную субъединицу фермента - фосфатазы 2A (PP2A). Несмотря на локализацию повтора CAG вблизи консервативных промоторных элементов, влияние экспансии на транскрипцию гена PP2A не доказано. Патогенез не известен.

Подходы к диагностике

Клиническая и молекулярно-генетическая диагностика БЭ основана на особенностях феномена экспансии. Первое появление признаков болезни соответствует превышению порога экспансии нуклеотидных повторов, который можно выявить при прохождении клеток через мужской и женский мейоз. К основным диагностическим признакам (их должно быть не менее трех) относятся следующие.

- Первый признак - это усиление тяжести симптомов у больных родственников в каждом последующем поколении в пределах одной семейной родословной, т.е. собственно феномен антиципации (см. выше). Антиципация объясняется ростом числа копий повторов в циклах клеточных (митотических и мейотических) делений либо по отцовской линии (например, рост повторов в мужском мейозе при хорее Гентингтона), либо по материнской линии (например, рост повторов в женском мейозе при миотонической дистрофии). Следует отметить, что у потомков пораженных лиц прогрессирование симптомов будет приходиться на более ранний возраст, а тяжесть течения болезни - нарастать с большей скоростью.

- Второй признак - это корреляция тяжести симптомов с числом повторов у больных как в одной и той же семейной родословной, так и разных семейных родословных.
- Третий признак - это парадокс Шермана или увеличение количества больных лиц в каждом последующем поколении. Причем этот парадокс зависит от того, кто из родителей передает мутацию потомкам. Основа парадокса Шермана - это наличие в семейной родословной здоровых носителей премутации (состояние до превышения порога экспансии).

Например, при синдроме Мартина-Белл переход из состояния премутации в полную мутацию возникает только в женском мейозе. При таком переходе число копий повторов будет заметно выше у сыновей, чем у дочерей женщин-носительниц мутации.

После обнаружения всех трех диагностических признаков врач вправе поставить предварительный диагноз БЭ и после этого обязан направить пациента на уточняющую лабораторную диагностику, принципы которой приведены на рис. 75. Для конкретной БЭ имеется свой вариант ПЦР-анализа, связанный с генокопированием мутантных аллелей. Разработаны два подхода.

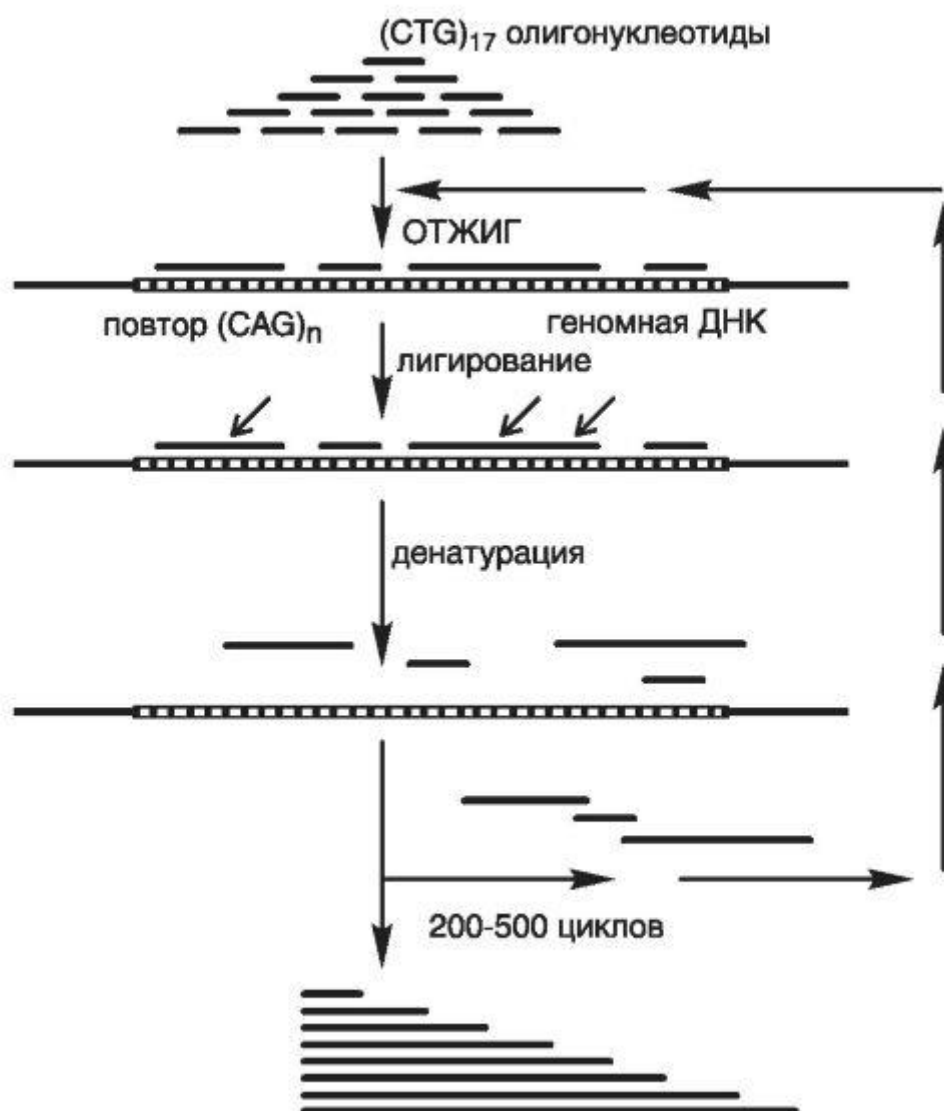


Рис.

Первый подход - экспансия в пределах 150 повторов регистрируется только методом ПЦР-анализа полиморфных повторов с последующей визуализацией продуктов амплификации и только с праймеров, которые фланкируют область повтора. При этом подходе применяется метод RED, позволяющий проводить скрининг генома пробанда на наличие потенциальной экспансии (премутации). Метод RED (обнаружение повторов экспансии) основан на отжиге* олигонуклеотидов - это повторы длиной 15-20 триплетов и последующем лигировании соседних олигонуклеотидов с их денатурацией с матрицы. Циклы повторяются сотни раз до накопления необходимого конечного продукта (см. рис. 75).

Второй подход основан на том, что при количестве копий повтора более 200 диагностика с помощью ПЦР-анализа затруднена, и тогда определение экспансии проводится с помощью блот-гибридизации ДНК-зондами, например, с помощью зондов STB12.3 и Oх 055 при синдроме FgaXA или зонда DNA25 при МД.

Кроме того, разработан простой и надежный метод диагностики синдрома хрупкой Х-хромосомы по образцам ДНК с метилированным (инактивированным) и неметилированным (функционально активным) промотором гена FMR1.

Подходы к лечению

Лечение БЭ традиционно симптоматическое.

В случае детского аутизма применяются нейрорептики, антидепрессанты, психостимуляторы, а также поэтапная психологопедагогическая коррекция. В России разработан эффективный способ коррекции детского аутизма по методу И.А. Сквицова (1992-1997).

Сущность метода заключается в метамерном микроинъекционном или безыгольном введении микродоз препаратов, изготовленных из мозга животных (церебролизин, церебролизат, церебролизат-М) или других биологических тканей.

* Отжиг - это техника гибридизации или процесс охлаждения ДНК, приводящий к восстановлению водородных связей между парами оснований. Этот процесс противоположен плавлению ДНК или разделению ее цепей под действием температуры (около 95 °C).

ГЛАВА 28 ИМПРИНТИНГ И БОЛЕЗНИ ИМПРИНТИНГА

Характеристика геномной памяти

Молекулярно-генетический процесс, в ходе которого модифицируются (маркируются) аллели родительских генов в локусах хромосом отцовского и материнского происхождения и обеспечивается моноаллельный характер их экспрессии, называется импринтом или эпигеномным процессом. Этот процесс также называют импринтингом или геномной памятью (см. главу 4), а сами маркированные гены называются импринтированными генами.

В настоящее время в геноме человека предполагается наличие от 100 до 200 генов, связанных с геномной памятью (уже выделено около 70 генов). Импринтированные гены локализованы в локусах большинства аутосомных хромосом (хромосомы 1-3, 5-7, 11, 13-15, 18, 19, 20 и 22) и локусах Х-хромосомы.

В указанных генных локусах в ходе их модификации возникают разные мутации: делеции (в том числе микроделеции, выявляемые при FISH-анализе), инверсии, транслокации и

другие структурные изменения (см. ниже). Таким образом, механизмы геномной памяти связаны с эпигеномным воздействием на экспрессию импринтированных генов. В последние годы обсуждается ряд таких механизмов. Среди них:

- амплификация некодирующих микросателлитных последовательностей;
- инаktivация крупных блоков структурного гетерохроматина;
- нарушение метилирования импринтированных генов;
- структурные нарушения регуляторных районов импринтированных генов;
- транспозиция повторяющихся нуклеотидных последовательностей.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЕЗНЕЙ ИМПРИНТИНГА

С нарушениями процессов геномной памяти связаны болезни импринтинга или болезни геномной памяти (БГП), объединяющие

24 нозологии, которые в зависимости от этиологической причины делятся на три класса:

- болезни генного импринтинга - 14 нозологий (58,3% всех БГП);
- болезни хромосомного импринтинга - 10 нозологий (31,7%);
- болезни ошибок импринтинга, обусловленные микроделециями в регуляторных областях импринтированных генов или центрах импринтинга (ЦИ) - две нозологии (входят в предыдущие два класса).

Болезни генного импринтинга

Этиология

При болезнях генного импринтинга наблюдается моноаллельная экспрессия в локусах хромосом одного из родителей. Причина - точковые мутации в генах, дифференцированно экспрессирующихся в зависимости от материнского и отцовского происхождения и приводящих к специфическому метилированию цитозиновых оснований в молекуле ДНК.

Эти мутации обуславливают развитие заболеваний, для которых большое значение имеют характер наследования и происхождение хромосом. К таким заболеваниям относятся:

- болезнь Гиршпрунга, обусловленная мутацией в гене RET (10q11.2); чаще всего наследуется по материнской линии;
- нейрофиброматоз Реклингаузена (тип 2) - мутация в гене SCH (22q12); наследуется по материнской линии;
- псориаз - проявляется тяжелее, если наследуется по отцовской линии;
- семейная гипертрофическая кардиомиопатия - наследуется по материнской линии;
- синдром Ангельмана (СА) - делеция критического района, находящегося в материнской хромосоме 15 (15q11.2-q13);
- синдром Вильямса - проявляется более выраженной задержкой физического и умственного развития и микроцефалией, если делеция затрагивает материнскую хромосому 7 (7q11.23);

- синдром «крика кошки» - проявляется более выражено, если делеция захватывает отцовскую хромосому 5 (5p15.3);
- синдром Корнелии де Ланге (3q26) - проявляется более выражено, если наследуется по материнской линии;
- синдром Прадера-Вилли (СПВ) - делеция критического района, находящегося в отцовской хромосоме 15 (15q11.2-q13);
- синдром Турета и поликистоз почек - проявляются раньше и тяжелее, если наследуются по материнской линии;
- тяжелая (злокачественная) шизофрения - проявляется более выражено, если наследуется по отцовской линии;
- spina bifida - наследуется по материнской линии (в 2 раза чаще, чем по отцовской линии);
- эпилепсия - проявляется тяжелее, если наследуется по материнской линии.

Следует отметить, что в случае СА и СПВ особенности молекулярной организации критического района хромосомы 15 связаны с гомологической рекомбинацией, мейотической нестабильностью и объясняют высокую частоту хромосомных aberrаций. В свою очередь, в семьях с повторными случаями СА и СПВ в геномах здоровых родственников обнаружены близко расположенные, но противоположно импринтированные гены, которые названы генами-кандидатами этих заболеваний (см. ниже).

Кроме того, обнаружена потеря фрагментов хромосом в клетках злокачественных опухолей, расцениваемая как потеря гетерозиготности (см. главы 17 и 25). Например, при нейробластомах утрачивался локус 1p36 материнского происхождения или наблюдалась гиперамплификация гена N-Мус в локусе 2p24 отцовского происхождения.

Механизмы патогенеза

Известны два механизма патогенеза, касающиеся как самой молекулы ДНК, так и молекул белков, входящих в состав хроматина хромосом, подверженных импринтингу.

Первый механизм - это нарушение метилирования импринтированных генов. В настоящее время хорошо изучена эпигенетическая модификация или специфическое метилирование цитозиновых остатков ДНК по 5-му углеродному атому. Это единственная допустимая в физиологических условиях химическая модификация, стабильно сохраняющаяся в ряду клеточных поколений и прямо или косвенно влияющая на экспрессию генов. У человека дифференцированное метилирование родительских аллелей наблюдается, как правило, внутри или рядом с ГЦ-богатыми районами, содержащими разные типы нуклеотидных повторов, между которыми нет гомологии, а длина единицы повтора каждый раз другая, и возможно его любое расположение по отношению к импринтированному гену, промотору или регуляторному участку. По-видимому, такие повторы вовлекаются в установку процесса импринтинга (метилирования гена). Они

служат мишенями для маркирования определенного аллеля за счет организации уникальной для него вторичной структуры ДНК. Так, показано, что эти повторы создают свернутые структуры, узнаваемые гетерохроматинспецифическими белками. Например, метилирование CpG-районов изменяет структуру ДНК с образованием формы z-ДНК, что ведет к полной инактивации импринтированных генов.

Второй механизм связан с особенностями структурной организации и функционирования хроматина в локусах, в которых располагаются импринтированные гены. В пользу этого указывают результаты экспериментов по изучению времени репликации импринтированных хромосомных доменов в S-фазе митоза. В частности, до репликации в клеточном ядре наблюдаются два гибридизационных сигнала, соответствующих материнскому и отцовскому аллелям импринтированного гена, а после репликации такой сигнал приобретает sdвоенную структуру. Асинхронность вычисляется как соотношение sdвоенных и одиночных сигналов.

В случае СПВ и СА критический район соответственно на отцовской или материнской хромосоме 15 раньше реплицируется в S-фазе. При этом время репликации коррелирует с уровнем активности генов и зависит от конденсации хроматина в районах промоторов и примыкающих к нему районах.

Инактивация транскрипции сопровождается уплотнением хроматина (гетерохроматизацией), в результате чего ДНК становится менее доступной для РНК-полимеразы и факторов, необходимых для инициации транскрипции. Химическая природа модификаций гетерохроматина до сих пор не выяснена. Имеются данные о взаимосвязи процессов упаковки хроматина и метилирования ДНК. Например, показано, что транскрипционно активный хроматин имеет пониженное содержание линкерного гистона H1, связывающего между собой нуклеосомы и упаковывающего их в фибриллы (см. главу 3). Этот гистоновый белок предпочтительно связывается с метилированными последовательностями ДНК.

Такое же сродство (аффинность) имеют негистоновые белки хроматина группы MeCP. При этом сила связывания определяется плотностью метилированных CG-динуклеотидов, а не конкретной нуклеотидной последовательностью. Некоторые из негистоновых белков хроматина подавляют транскрипцию непосредственно, например в белке MeCP2 для этого имеется специальный домен.

Таким образом, установка процессов метилирования ДНК про-

исходит только в импринтированных локусах на последующих этапах дифференцировки гамет. Основным ферментом, обеспечивающим метилирование *de novo* у млекопитающих, является ДНКметилтрансфераза, или Dnmt1 (см. главу 7). Вместе с тем, остается невыясненным механизм распознавания нуклеотидных последовательностей ДНК, которые должны быть по-разному метилированы в отцовском и материнском гаметогенезе. В этой связи были выделены два альтернативных способа сплайсинга 5'-экзонов гена Dnmt1, один из которых реализуется в оогенезе, другой - в сперматогенезе.

При прямом эпигеномном воздействии на экспрессию конкретного гена метилированию подвергается сам импринтированный ген. В этом процессе участвуют ДНК-связывающие белки, вызывающие гетерохроматизацию метилированного локуса. В результате доступ активаторов транскрипции к ДНК ограничивается, и экспрессия гена останавливается. При этом действие многочисленных факторов транскрипции зависит от характера метилирования ДНК. Среди этих факторов выделяют, с одной стороны, метилчувствительные активаторы и метилзависимые репрессоры (они опосредуют инактивацию метилированного гена), а с другой стороны - метилчувствительные репрессоры и метилзависимые активаторы (они обеспечивают экспрессию метилированного гена).

В случае косвенного влияния метилирования на экспрессию импринтированного гена предполагается модификация не самого гена, а другого гена - импринтора, находящегося на той же хромосоме в цис-положении. При этом функция гена-импринтора направлена на

поддержание моноаллельной экспрессии одного или нескольких импринтированных локусов в пределах конкретного кластера генов.

Как оказалось, гены-импринторы часто (если не всегда) кодируют нетранслируемые РНК - это универсальный механизм конкурентной экспрессии, необходимый для поддержания в соматических клетках моноаллельной экспрессии всех импринтированных генов, включая гены, относящиеся к кластеру генов СПВ и СА.

Таким образом, общей особенностью импринтированных генов, находящихся в составе критических районов хромосом, является наличие генов, кодирующих нетранслируемую РНК. Например, для СПВ и СА обнаружено несколько таких генов (ZNF127AS, PAR5, PARSN, IPW, PAR1, C15orf2, PWCR1, UBE3A-AS). Некоторые из них синтезируются на антисмысловой цепи соответствующих генов (AS

означает «антисенс» - см. главу 20). В частности, на антисмысловой цепи белок-кодирующего гена ZNF127 транскрибируется в противоположном направлении нетранслируемая антисмысловая РНК, или ZNF127AS. Причем ген ZNF127 и его антисмысловой аналог ZNF127AS активны только на отцовской хромосоме.

Антисмысловая РНК также обнаружена для гена UBE3A, но его транскрипция (как и UBE3A-AS) происходит на разных родительских хромосомах. Так, UBE3A-AS экспрессируется на отцовской хромосоме и только в тех тканях мозга, в которых UBE3A подвержен импринтингу и активен только на материнской хромосоме. В остальных тканях, где UBE3A экспрессируется биаллельно, транскрипт UBE3A-AS не обнаруживается.

В целом можно заключить, что механизмы генного импринтинга остаются малоизученными.

Болезни хромосомного импринтинга

Этиология

Для болезней хромосомного импринтинга характерна однородительская дисомия (ОРД) или наличие двух копий хромосомы либо отцовского, либо материнского происхождения (см. главу 4). Термины: «однородительская дисомия» или «изодисомия» впервые предложены Э. Энжелом в 1980 г. для обозначения одного из типов анеуплоидии в гаметах млекопитающих. Эти термины указывают на наличие у диплоидного потомства двух локусов, полученных от одного и того же родителя, тогда как в норме наследуется только по одному локусу от каждого родителя. Примерами таких заболеваний служат:

Третий механизм - это коррекция моносомии до дисомии при оплодотворении нормальной и нуллисомной гамет с формированием моносомной зиготы и последующей дупликацией в ней моносомной хромосомы.

На основе этих механизмов формируется ОРД двух типов.

1. Гетеродисомия или наследование двух разных гомологичных хромосом от одного из родителей. Этот тип ОРД обусловлен либо комплементацией гамет, либо коррекцией трисомии до дисомии и наблюдается у большинства больных с СПВ в результате нерасхожде-

ния материнских хромосом в первом делении мейоза. Вероятность нерасхождения, по-видимому, зависит от возраста матери, превышающего 30 лет на момент рождения ребенка.

2. Изодисомия или наследование двух копий одной хромосомы от одного из родителей.

Болезни ошибок импринтинга

Этиология

Болезни ошибок импринтинга - результат микроделений в регуляторных областях импринтированных генов, или центрах импринтинга (ЦИ).

Первое сообщение о таких болезнях относится к 1993 г., когда у больных с СПВ и СА не было отмечено типичных делеций критического района хромосомы 15 (15q11.2-q13), но также (как и в случае ОРД) наблюдался одинаковый характер метилирования обеих родительских копий этого критического района. В дальнейшем выяснено, что в одном случае была одинаковой и соответствовала характеру метилирования на обеих родительских хромосомах экспрессия импринтированных генов, локализованных в критическом районе и характерных для СПВ (гены: SNRPN, ZNF127, PAR1, PAR5, IPW, PWSR1, C15orf2).

Молекулярно-генетические исследования показали, что ошибки импринтинга часто сопровождаются микроделениями ЦИ. Сами делеции в ЦИ не связаны с клиническими проявлениями, но могут выявляться у здоровых родителей и других родственников больных пробандов. Анализ родословных в таких семьях свидетельствует, что делеции ЦИ наследуются (без клинических проявлений) в ряду поколений у лиц одного и того же пола. Таким образом, к заболеваниям этой группы относятся те же два синдрома (СПВ и СА), однако вызваны они другими генетическими причинами, т.е. это их генетические варианты.

Механизмы патогенеза

При генетических вариантах СПВ и СА показано, что на одной из родительских хромосом изменен на обратный или инвертирован характер метилирования (и экспрессии) генов. Это объясняется переключением (эпигеномной заменой) генов хромосомы 15 в гаметогенезе одного из родителей, возникшим в результате ошибок в ЦИ. Предложены две модели такой замены в гаметогенезе:

- первая модель - эпигеномное переключение только в той гомологичной хромосоме, которая получена от родителя противоположного пола, тогда как вторую гомологичную хромосому модификация не затрагивает;
- вторая модель - это предварительное «стирание» существующей геномной «памяти» на обеих родительских хромосомах с последующим установлением «памяти», соответствующей данному полу; эта модель наиболее предпочтительна.

ОТДЕЛЬНЫЕ НОЗОЛОГИИ

Синдром Прадера-Вилли

СПВ впервые описан в 1956 г. Встречается с частотой 1:10-20 тыс. Как правило, возникает спорадически, хотя известны семейные формы.

Основные признаки: черепно-лицевой дисморфизм (долихоцефалия, миндалевидный разрез глазных щелей, гипертелоризм, эпикант, микрогнатия, «рыбий рот», высокое нёбо, диспластичные ушные раковины, акромикрия, нарушения дерматоглифики), низкий рост, ожирение, мышечная гипотония, гипогонадизм, гипопигментация, задержка умственного развития.

Продолжительность жизни больных не превышает 25-30 лет.

Этиология и механизмы патогенеза СПВ и «альтернативного» ему по генетической природе СА были изучены в последние годы. Выделены три генетические причины СПВ

Первая (основная) причина - это делеция критического района отцовской хромосомы 15 (15q11.2-q13) - 95% случаев генного импринтинга. Столь высокая частота этой мутации обусловлена мейотической нестабильностью указанного хромосомного района. Показано: делеции (как и в случае СА) могут возникать в гаметогенезе в результате внутриили межхромосомных перестроек. Причем внутрихромосомные делеции происходят путем образования большой петли, имеющей 3-4 млн н.п.

Рассмотрим молекулярную организацию критического района хромосомы 15. На рис. 76 приведена молекулярная структура этого критического района хромосомы 15.

На рис. 76 обозначены два кластера точек разрывов при делециях, картированных проксимальнее гена ZNF127, локализованного в этом критическом районе.

Здесь же расположены три белок-кодирующих гена (NDN, MAGEL2, SNRPN) и 7 генов, кодирующих нетранслируемые РНК (ZNF127AS, PAR5, PARSN, IPW, PAAR1, C15orf2, PWCR1), - все гены в этих локусах при СПВ экспрессируются моноаллельно на отцовской хромосоме. Для трех из указанных генов (гены NDN, ZNF127, SNRPN) показана тканеспецифическая экспрессия в нейронах головного мозга.

Неимпринтированная область хромосомы 15 находится в дистальной части критического района 15q11.2-q13. Она включает несколько биаллельно функционирующих генов, в том числе локус Р (отвечает за пигментацию кожи и глаз), гены GABRB3, GABRA3 и GABRG3 (кодируют субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты, или ГАМК-А), и ген HERC2. Последний ген филогенетически относится к самым древним генам: он считается родоначальником семейства END-псевдогенов, возникшего в результате нескольких последовательных дупликаций. Считается, что END-псевдогены способствуют процессам гомологической рекомбинации и неравного кроссинговера между повторяющимися последовательностями ДНК в критическом районе 15q11.2-q13 (см. главу 3).

К первопричинам СПВ, обуславливающим только 5% случаев генного импринтинга, относятся: инвертированная дупликация (тетрасомия), простая дупликация (трисомия), несбалансированная транслокация (моносомия), а также сбалансированная транслокация и инверсия критического района отцовской хромосомы 15 (15q11.2-q13).

Вторая причина СПВ - это ОРД по материнской хромосоме 15, обуславливающая 25% случаев болезни (см. выше).

- *Третья причина* СПВ - это ошибки импринтинга (см. выше). Генами-кандидатами СПВ являются следующие. Ген SNURF-SNRPN - состоит из 10 экзонов и имеет необычную бицистронную структуру. Его мРНК-транскрипт содержит две неперекрывающиеся рамки считывания для двух разных белков: первый белок SNURF (по-видимому, участвует в регуляции экспрессии импринтированных генов на отцовской хромосоме), второй белок N или SmN (является компонентом малых ядерных рибонуклеопротеинов - мяРНП). Анализ экспрессии двойного транскрипта гена SNURF-SNRPN показал его присутствие во всех тканях. Кроме двойного транскрипта, в мышечной и почечной тканях была обнаружена укороченная мРНК, соответствующая 1-34 экзонам этого гена.

стадию S. При этом некий максимально экспрессируется в нейронах гипоталамуса, контролирующего процессы развития ожирения и гипогонадизма у больных.

- Локус Р - располагается в дистальной части критического района хромосомы 15, экспрессируется биаллельно, контролирует пигментацию кожи и радужки глаз. Потеря двух аллелей локуса Р ведет к альбинизму и гипопигментации кожи (у гетерозигот).

Синдром Ангельмана

СА впервые описан в 1965 г. под названием синдрома «счастливой куклы». Основные признаки: микробрахицефалия с уплощенным затылком, большая нижняя челюсть, открытый рот, выступающий язык, макростомия, редкие зубы, гипопигментация.

У больных детей наблюдается задержка психомоторного развития, невозможность обучения, явления атаксии, гиперкинезия, мышечная гипотония, судорожная готовность и гиперрефлексия. Постоянны приступы неконтролируемого смеха и хлопания в ладоши.

В основе синдрома лежат те же причины, что и при СПВ, однако затронута не отцовская, а материнская хромосома.

Первая причина - варианты делеции критического района материнской хромосомы 15 (15q11.2-q13), возникающие в гаметогенезе в результате внутри- и межхромосомных перестроек (см. выше).

Вторая причина - ОРД отцовской хромосомы 15, возникающая при нерасхождении хромосом в оогенезе и зависящая от возраста матери на момент рождения ребенка (см. выше).

Третья причина - ошибки в ЦИ. Генами-кандидатами СА являются следующие.

- Ген UBE3A - основной ген-кандидат, мутации в котором обуславливают развитие 20% случаев СА. Этот ген кодирует фермент УБ-АР убиквитин-протеинлигазу, экспрессия которой обнаружена во всех тканях. Кодируемый белок служит коактиватором для рецепторов стероидных гормонов. В ряде структур головного мозга ген UBE3A активен только в материнской хромосоме, что может объяснить развитие атаксии и тремора дефицитом кодируемого геном фермента в клетках Пуркинье, а развитие эпилептических припадков и невозможность обучения ребенка - отсутствием экспрессии этого гена в нейронах гиппокампа. Ген UBE3A транскрибируется с нескольких промоторов и имеет 7 нетранслируемых экзонов со стороны 5'-конца. Среди мутаций данного гена преобладают мутации со сдвигом рамки считывания и нонсенс-мутации. Описаны также инверсии с точками разрывов внутри

гена UBE3A.

- Ген ATP1C - кодирует аминокислототранспортирующую АТФазу. Экспрессируется преимущественно с материнского аллеля в фибробластах кожи и в разных структурах мозга. Передает сигналы в ЦНС и поддерживает контакты между клеточными мембранами. Отсутствие продуктов экспрессии этого гена в мозге больных СА ведет к тяжелому детскому аутизму.

- Ген GABRB3 является одним из генов кластера ГАМК_A-рецепторных генов, расположенных между геном UBE3A и локусом Р. Эти рецепторные гены попадают в область наиболее частых делеций критического района. Ген GABRB3 кодирует бета-3-субъединицу ГАМК_A-рецептора. Поэтому симптоматика СА (моторные нарушения, нарушения памяти, неспособность к обучению, судорожные припадки) может быть обусловлена гаплонедостаточностью данного гена.

Синдром Беквитта-Видемана

Синдром Беквитта-Видемана (СБВ) относится к распространенным наследственным заболеваниям с частотой в популяции 1:10- 12 тыс. Тип наследования болезни аутосомно-доминантный с неполной пенетрантностью и варьирующей экспрессивностью.

Примерно 15% всех случаев СБВ расцениваются как семейные формы.

Основные клинические признаки СБВ: гигантизм (масса тела при рождении свыше 3900 г), черепно-лицевой дисморфизм (долихоцефалия, гипоплазия верхней челюсти и средней трети лица, прогнатизм, макроглоссия, вертикальные насечки на мочках и небольшие полулунные ямочки на задней поверхности завитков ушных раковин), гемангиомы на лбу, пигментные пятна на коже затылка и лица, пупочная грыжа. У всех больных наблюдается вицеромегалия внутренних органов или увеличение размеров гонад, надпочечников, печени, поджелудочной железы, предстательной железы, почек и селезенки. Предполагается, что вицеромегалия связана с сохранением паракринной и эндокринной функций частью эмбриональных клеток на пренатальном и постнатальном этапах онтогенеза. У 15% больных с СБВ выявляется УО. У многих больных наблюдается повышенная предрасположенность к развитию онкогенных заболеваний, например частота нефробластомы достигает 59%, карциномы надпочечников - 15%, гепатобластомы - 2%.

Важный диагностический признак - гемигипертрофия, наблюдаемая в 12,5% случаев СБВ, а у больных с опухолями этот признак проявляется в каждом втором случае.

Критической областью для СБВ является терминальная часть короткого плеча хромосомы 11 (11p15.5). В этой области расположен кластер импринтированных генов, перемешанных с неимпринтированными генами (рис. 77).

Критическая область включает в левой части (по отношению к центромере) 6 генов и ограничена геном NAP2; в правой части - 7 генов и ограничена геном L 23.

Кластер генов критической области хромосомы 11(11p15.5) начинается с *первого гена* - NAP2, биаллельно экспрессирующегося в эмбриональных и зрелых тканях.

Второй ген - IPL/TSSC3 - преимущественно экспрессируется с материнского аллеля и ограниченно - с отцовского аллеля; наиболее активен в плаценте, легких, миокарде, печени, поджелудочной железе и почках. В клетках мозга взрослых людей и лимфоцитах крови он экспрессируется биаллельно. При развитии опухолей головного мозга ген IPL/TSSC3, по-видимому, выполняет роль гена-супрессора материнского аллеля.

Третий ген - IMPTI/TSSC5 - кодирует белок мембранного переносчика, контролирующего полиспецифический транспорт и множественную лекарственную устойчивость.

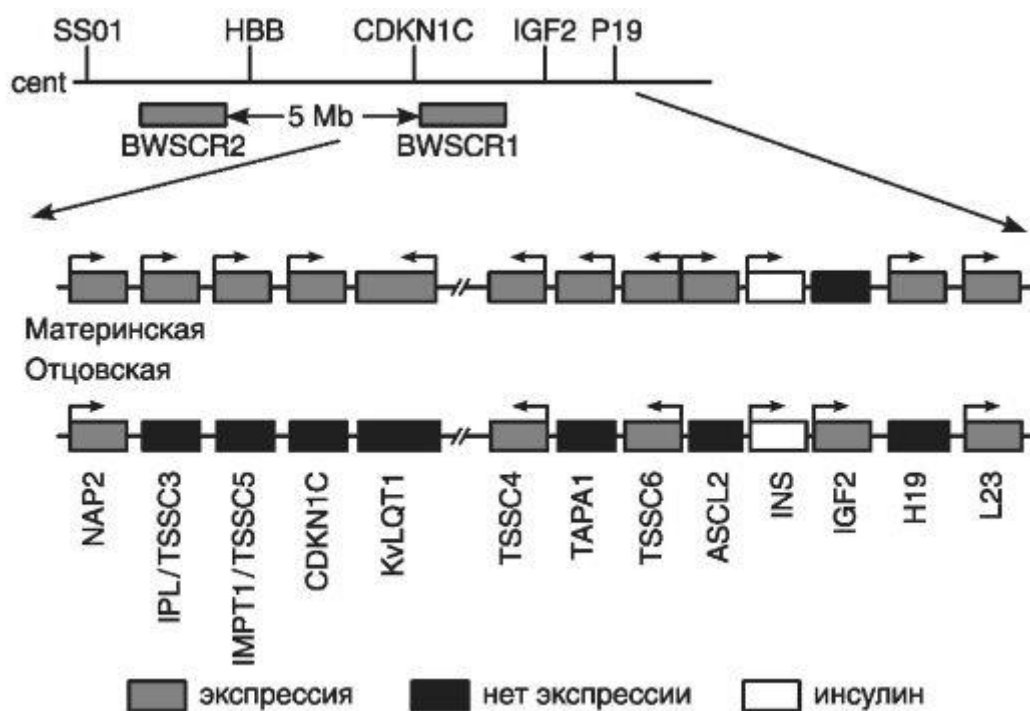


Рис.

77. Схема молекулярной организации критической области 11p15.5 (по Немцовой М.В. и Залетаеву Д.В., 2004)

Кроме того, точковые мутации этого гена и потеря его материнской копии были идентифицированы при раке грудной железы, нефробластоме и рабдомиосаркоме.

С антисмысловой цепи ДНК транскрибируется другой ген этого локуса - ген IMPT1-AS, имеющий множество сайтов инициации транскрипции, но экспрессирующий только два транскрипта. Считается, что этот ген не транслируется и поэтому не относится к импринтированным генам.

Четвертый ген - CDKN1C - также известен как ген p57KIP2. Он кодирует ингибитор циклинзависимой киназы, относящийся к CIP-зависимым регуляторам клеточного цикла. Его гиперэкспрессия останавливает клеточный цикл в предсинтетической стадии.

В гене обнаружены точковые мутации, в связи с чем он считается реальным геном-кандидатом синдрома СБВ. Мутации гена p57 KIP

встречаются в 40% семейных и 5% спорадических случаев СБВ. В самом гене суммарная частота мутаций составляет 10-15%.

В клетках таких опухолей, как карцинома надпочечников, нефробластома и рабдомиосаркома, выявляется гиперэкспрессия гена p57 KIP с материнского аллеля.

Роль *пятого гена* - KvLQT1 - в этиологии СБВ точно не определена, однако считается, что он участвует в процессе импринтинга при этом заболевании. Данный ген кодирует белок, формирующий заслонку калиевых каналов. Он экспрессируется биаллельно только в сердечной мышце; его точковые мутации сопровождаются доминантно наследуемым дефектом проводимости сердечной мышцы или LQT-синдромом (удлиненный Q-T-интервал и желудочковая аритмия), а также аутосомно-рецессивным синдромом Джервила-Ланге-Нильсона, сочетающимся с аналогичными нарушениями проводимости миокарда и глухотой. Ген этого синдрома (KvLQT1) экспрессируется с материнского аллеля и обнаруживается в большинстве тканей организма, но он почти не экспрессируется в мозге и скелетных мышцах. В интроне гена KvLQT1 обнаружен ген

LIT1 (см. ситуацию «ген в гене», глава 1), транскрибирующийся с антисмысловой цепи, но только с отцовской хромосомы.

При СБВ установлена биаллельная экспрессия этого гена, тогда как при нефробластоме наблюдается лишь моноаллельная его экспрессия.

Шестой ген TSSC4 и *восьмой ген* TSSC6 не относятся к импринтированным генам СБВ, но они кодируют белки с опухоль-подавляющей функцией, например белки с предполагаемой опухоль-подавляющей функцией в случае рабдомиосаркомы. Между этими генами расположен *седьмой ген* - TAPA1 (CD81), кодирующий интегральный мембранный белок, обнаруженный в разных типах клеток. Этот ген участвует в развитии на ранних этапах Т-лимфоцитов. Он экспрессируется только с материнской хромосомы.

Девятый ген - ASL2, также экспрессирующийся с материнского аллеля. Его белковый продукт является фактором транскрипции, содержащим мотив: спираль-петля-спираль (см. главу 8). Этот белок участвует в развитии трофоэктодермы.

Десятый ген - INS (ген инсулина) имеет биаллельную экспрессию, а находящийся рядом с ним инсулиноподобный фактор роста IGF2 кодирует fetalный фактор роста.

Одиннадцатый ген или IGF2-фактор экспрессируется только с отцовского аллеля, может быть митогеном для всех типов клеток, но у человека он специфически модулирует рост и дифференцировку мышечных клеток. Нарушение экспрессии IGF2 обуславливает органомегалию при СБВ. Биаллельную экспрессию IGF2 обнаруживают в нефробластомах, карциномах коры надпочечников, рабдомиосаркомах, других эмбриональных опухолях, встречающихся при СБВ.

Двенадцатый ген H19 кодирует нетранслируемую РНК с неустановленной функцией. Этот ген тесно сцеплен с предыдущим геном IGF2; их экспрессия регулируется общим энхансером, расположенным в 3'-конце гена H19, который имеет противоположный импринтинг с материнской хромосомы.

Тринадцатый ген L23 кодирует рибосомоподобный белок, экспрессирующийся биаллельно в эмбриональных и зрелых тканях. Этим геном ограничена дистальная часть критической области 11p15.5.

К генетическим вариантам СБВ относятся:

- частичная трисомия дистальной части короткого плеча хромосомы 11 (результат аномальной сегрегации в мейозе структурных перестроек отцовского происхождения);
- спорадические дупликации критической области хромосомы 11 (11p15.5); их частота (совместно с частичной трисомией) - около 2%;
- однородительская отцовская дисомия (результат постзиготической митотической нестабильности - рекомбинации с высокой долей мозаицизма);
- сбалансированная транслокация между хромосомами 11 и 22, унаследованная от матери.

Помимо этих генетических вариантов, идентифицированы точковые мутации в одном из двух генов-кандидатов СБВ - гене CDKN1C, с которым связывают 10-15% всех мутаций.

Другой ген-кандидат СБВ - IGF2 не имел точковых мутаций, но его экспрессия у больных проходила либо только с материнской хромосомы, либо наблюдалась ОРД по отцовской хромосоме 11, т.е. в данном случае имела место потеря импринтинга (ПИ).

Описан больной с унаследованной от матери сбалансированной инверсией короткого плеча хромосомы 11 с точками разрывов в области СБВ-ХР2 (см. ниже), что также объяснялось ПИ при нормальном эпигенотипе H19.

Таким образом, определенная часть спорадических случаев СБВ не связана с указанными выше генетическими вариантами, а объяс-

няется ПИ. В общей сложности, структурные аномалии хромосомы 11 выявляются у 2% больных с СБВ. Первым по частоте повреждаемости является район локализации гена KvLQT1, обозначаемый как СБВ-ХР1; два других района - СБВ-ХР2 и СБВ-ХР3 - расположены ближе к центромере на 5 и 7 млн н.п. соответственно. В районе СБВ-ХР2 выделены два гена, содержащих мотив «цинковые пальцы» (см. главу 8). Это гены ZNF214 и ZNF215, второй ген имеет пять альтернативных и один антисмысловой транскрипты, в норме экспрессирующиеся только с материнского аллеля. Структура хромосомного района СБВ-ХР3 пока не изучена.

Подходы к диагностике

Непосредственными причинами болезней импринтинга являются не только генетические нарушения (точковые, структурные и хромосомные мутации), но и функциональные нарушения, связанные с взаимодействием между импринтированными и неимпринтированными генами в критических областях хромосом.

В случае мутаций диагностическими тестами являются молекулярногенетические и цитогенетические методы исследования наследственного материала. Например, при СПВ и СА критическим районом служат локусы 15q11.2-q13, а при СБВ - locus 11p15.5. В случае функциональных нарушений с диагностической целью исследуется экспрессия импринтированных генов, и ее результаты строго соотносятся с характером метилирования. При СПВ и СА происходит инактивация генов за счет либо отцовского, либо материнского гиперметилирования двух локусов: D15S63 (ген PW71) и D16S9 (ген ZNF127), а также инактивация промоторной области гена SNRPN. При СБВ гиперметилирование касается импринтированных генов IGF2 и LIT1, которые моноаллельно экспрессируются (метируются) с отцовского или материнского аллелей.

В основе тестов для диагностики СПВ, СА и СБВ лежит анализ аллельного метилирования критических областей хромосом. Применяются три метода.

- Анализ аллельного метилирования локусов импринтированных генов. Используя метод, учитывают, что при СПВ независимо от его причины присутствуют только метилированные аллели, а при СА - только неметилированные аллели локусов критических областей хромосом.
- Бисульфатная модификация ДНК и метилспецифическая ПЦР. Метод основан на модификации геномной ДНК бисульфитом
- натрия, позволяющим осуществить химическое превращение неметилированных остатков цитозина в урацил, в то время как 5-метилцитозин остается неизменным. По измененному нуклеотидному составу судят о состоянии метилирования каждого цитозинового остатка на исследуемом фрагменте ДНК. В частности, при СПВ образуется продукт той длины, которая соответствует метилированному материнскому аллелю, а при СА обнаруживается неметилированный отцовский аллель. Для анализа применяется набор из трех праймеров (общий, материнский и отцовский). Материнский и отцовский праймеры попарно с общим праймером дают продукты амплификации, равные 313 и 221 н.п. соответственно. Разновидностью этого метода является МС-ПЦР, используемая для скрининговой диагностики СПВ и СА, но без определения их генетических причин.

Анализ микросателлитного полиморфизма локусов критического района 15q11.2-q13. Метод позволяет идентифицировать делеции и ОРД на основе анализа микросателлитного полиморфизма в локусах D15S11 (входит в область наименьшего перекрытия всех делеций при СПВ), D15S113 (расположен внутри области перекрытия всех делеций при СА) и GABRB3 (характеризуется большим количеством аллелей и гетерозиготностью). Обычно формируются делеции стандартной протяженности (4 млн н.п.), перекрывающие все три локуса. Анализ этих трех локусов можно проводить методом мультиплексной ПЦР с тремя парами праймеров. При отсутствии делеций и ОРД при диагнозе СПВ и СА, подтвержденном на основе анализа метилирования, можно предполагать наличие делеции или мутации в ЦИ. В случае СА (если результат анализа метилирования отрицательный) причиной наследственной природы заболевания может быть мутация в гене-кандидате UBE3A, что имеет большое значение для МГК семьи и прогноза рождения здорового потомства.

Подходы к лечению

Подходы к радикальной этиологической и патогенетической терапии болезней импринтинга не разработаны, поэтому их лечение только симптоматическое.

ГЛАВА 29 ПРИОННЫЕ БЕЛКИ И ПРИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

Характеристика белков-прионов

Термин «прион» впервые появился в середине XX в. Природа этого фактора долгое время оставалась неизвестной. Только в 1966 г. было обнаружено, что агент, вызывающий болезнь скрепи у овец, обладает необычными свойствами: устойчив к ионизирующей радиации и ультрафиолетовому свету. Это поставило под сомнение популярную тогда гипотезу, что болезнь скрепи вызывается вирусом.

В 1967 г. Д. Гриффит высказал предположение, что прион как инфекционный агент не приносит новый генетический материал, а представляет собой измененную форму одного из клеточных белков, самоподдерживающихся за счет автокаталитического механизма.

В 1982 г. С. Прузинер и соавторы выделили такой агент из мозга больных животных и описали его. Выяснилось, что этот белок обладает необычными свойствами: устойчив к нагреванию, сохраняет активность после обработки мочевиной, протеиназой К, разными веществами, повреждающими ДНК (нуклеазы и псоралены). Однако он чувствителен к ионизирующей радиации в присутствии кислорода, т.е. проявляет свойства, характерные для гидрофобных белков, связанных с липидами.

В дальнейшем белок, вызывающий болезнь скрепи, получил название «прион» (prion - proteinacious infectious particle) или PrP (Prion Protein). Затем на основе определения первичной структуры PrP был идентифицирован кодирующий его ген - PRNP, который присутствует в геномах всех млекопитающих, птиц и рыб.

У человека такой ген локализован в коротком плече хромосомы 20 (20p), имеет протяженность 16 тыс. н.п. и содержит 2 экзона. Его белок PrP входит в состав клеточных мембран и экспрессируется в разных тканях (в основном ЦНС и лимфотетической ткани).

Нормальная форма белка PrP обозначается как PrP[^]. Пространственная структура рекомбинантного PrP была впервые определена методом ядерного магнитного резонанса.

Аминоконцевой район нормального белка PrP в растворе не был структурирован, а его карбоксиконцевая часть формировала гло-

булу и состояла из трех β -спиралей (42%) и короткого участка с α -структурой (3%).

Патологическая форма белка, обуславливающая его инфекционность, была названа PrP^{Sc} (форма scrapie). Его глобула содержит 30% β -спиралей и 43% α -структур.

Как установлено, и нормальная, и патологическая формы прионного белка неотличимы друг от друга по аминокислотной последовательности, но имеют разную конформацию.

В результате обработки PrP^{Sc} протеиназой К образовывался протеазоустойчивый фрагмент с молекулярной массой 27-30 кДа. Молекулярная масса PrP^C варьировала от 33 до 35 кДа в зависимости от степени гликозилирования. Вследствие указанных различий было предположено, что приобретение нормальным белком PrP^C инфекционных свойств связано с его конформационным переходом в патологическую форму с образованием β -складчатого слоя.

Концепция прионов

На основании полученных С. Прюзинером экспериментальных данных была сформулирована концепция прионов.

Ее положения: инфекционным агентом является белок PrP^{Sc}, который реплицирует себя при отсутствии нуклеиновой кислоты; превращение белка из нормальной формы PrP^C в инфекционную форму PrP^{Sc} происходит путем конформационного перехода, идущего разными путями: спонтанно (*спорадические формы*), на основе поступления извне патологической формы PrP^{Sc} (*приобретенные формы*), в результате мутаций в гене PRNP, обуславливающих образование PrP^{Sc} из PrP^C (*наследственные формы*).

В настоящее время концепция прионов подтверждена новыми доказательствами. Перечислим их:

- организмы, лишенные PrP^C, устойчивы к инфицированию;
- с помощью системы циклической амплификации (формирование PrP^{Sc} *in vitro*) показана инфекционность прионного белка;
- образование патологической формы PrP^{Sc} в первом цикле амплификации происходит на его матрице, а в последующих циклах дальнейшему превращению PrP^C в патологическую форму способствует уже полученная форма PrP^{Sc};
- конформационный переход нормальной формы PrP^C в патологическую форму PrP^{Sc} нарушается под действием ультразвука;
- свойства патологической формы PrP^{Sc} у экспериментальных животных соответствуют свойствам патологической формы PrP^{Sc}, полученной из мозга больных животных;
- интрацеребральное введение патологической формы PrP^{Sc} здоровым хомякам индуцирует у них болезнь скрепи со смертельным исходом;
- губчатая дегенерация нервной ткани у умерших животных не отличима от таковой у животных, зараженных патологической формой PrP^{Sc}, продуцированной *in vivo*;
- полученная *in vitro* патологическая форма PrP^{Sc} менее инфекционна, чем форма, полученная *in vivo*;
- передача «прионной инфекции» между млекопитающими ограничена межвидовыми барьерами, хотя эти барьеры не абсолютны, что объясняется различиями в первичной

структуре PrP у млекопитающих разных видов; однако возможность заражения хомяков болезнью овец скрэпи, а коз - болезнью Крейтцфельда-Якоба доказана;

- губчатые энцефалопатии передаются между организмами одного или близкородственных видов (болезнь Крейтцфельда-Якоба передается от человека к человеку, от человека к шимпанзе; болезнь скрэпи передается среди овец и коз, но не передается к шимпанзе);
- случаи заражения человека болезнью овец скрэпи не установлены;
- передача «прионной инфекции» ограничена различиями в первичной структуре белка PrP и его штаммовой принадлежностью.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Прионные болезни (ПБ) - это «конформационные» болезни человека и животных. Они обусловлены нарушениями процессов формирования пространственной структуры прионных белков, приводящими к изменениям внутриклеточной и межклеточной физиологии. К «конформационным» болезням также относятся амилоидные заболевания, например болезни Альцгеймера, Паркинсона и хорея Гентингтона, при которых происходит внутри- и внеклеточное накопление патологических фибриллярных белков.

ПБ известны давно. Первые упоминания о болезни скрэпи у овец появились в середине XVIII в., а первые сообщения о губча-

той энцефалопатии у быков или «коровьем бешенстве», относятся к XIX в. В свою очередь, некоторые тяжелые нейродегенеративные болезни человека, такие, как болезнь куру или «смеющаяся болезнь», выделены в середине XX в. (в племени каннибалов Новой Гвинеи). Болезни Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, Крейтцфельда-Якоба, а также семейная фатальная инсомния (бессонница) впервые описаны в конце XX в.

Все известные в настоящее время ПБ человека считаются смертельными: летальный исход после их манифестации наступает спустя 6 мес-5 лет.

Как отмечено выше, ПБ делятся на спорадические (80-85%), наследственные (около 15-20%) и приобретенные (менее 1%).

Инфекционность ПБ показана Р.Л. Чандлером (1961), заразившим лабораторных мышей болезнью овец скрэпи. Позднее Д.К. Гайдушеку и соавторам (1966) удалось передать от человека к шимпанзе болезнь куру (см. ниже). Заражение человека и животных белками-прионами обычно происходит при употреблении в пищу мяса больного животного (особенно мозга) или другими путями.

Экспериментально заражение животных производится путем интраперитонеального или интрацеребрального введения здоровому животному гомогената мозга больного животного.

Этиология

ПБ развиваются в результате мутаций в гене, кодирующем экспрессию прионного белка, или при передаче патологической формы белка, находящегося в чужеродном биологическом материале, человеку при инфицировании. Во втором случае изучены пути инфицирования. Ими оказались: потребление в пищу мяса коров, страдающих бешенством, каннибализм, переливание крови, трансплантация органов и тканей, прием лекарств, содержащих гормоны человека (гипофизарный гонадотропин, соматотропин), и ятрогенный путь через недостаточно стерилизованные нейрохирургические инструменты.

При образовании новых мутаций или наследовании от предыдущих поколений уже имеющихся у человека точковых мутаций в гене PRNP характерен аутосомно-доминантный тип передачи гена, локализованного в хромосоме 20p - это 15-20% случаев ПБ.

В больном организме запускается механизм (до периода манифестации первых признаков) синтеза патологической формы PrP^{Sc},

кодируемой геном PRNP, который обычно производит нормальную форму PrP^C, транспортируемую через аппарат Гольджи на поверхность клеточных мембран нервных клеток. При развитии патологического процесса в везикулах цитоплазмы нейронов накапливается форма PrP^{Sc}.

Всего идентифицировано около 25 точковых мутаций в гене PRNP (аллельных вариантов), приводящих к разным нозологиям ПБ. В числе мутаций гена PRNP выделены: миссенс- и нонсенс-мутации кодирующей области гена и инсерции дополнительных копий октапептид-кодирующих повторов проксимальной части гена. Как оказалось, основные нозологии ПБ - болезни Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, Крейтцфельда-Якоба и фатальная семейная инсомния - относятся к аллельной серии гена PRNP.

В последние годы выделена вторая патологическая форма прионного белка - PrP²⁷⁻³⁰. Однако ее ген пока не локализован. Вместе с тем, вторая форма белка присутствует в специфических структурах пораженных клеток, называемых «прионными палочками»; морфологически и гистохимически они не отличаются от амилоидных структур, накапливаемых в нервных синапсах при развитии неврологической симптоматики и деменции.

Механизмы патогенеза

Механизмы патогенеза ПБ изучены недостаточно. Согласно концепции прионов, образование патологической формы PrP^{Sc} в первом цикле амплификации происходит на матрице PrP^{Sc}, а в последующих циклах превращению нормальной формы PrP^C в патологическую форму способствует уже сформировавшаяся патологическая форма PrP^{Sc}, вызывая экспоненциальный (неконтролируемый) рост числа патологических молекул PrP^{Sc}, т.е. своеобразную цепную реакцию.

Следовательно, пусковой механизм ПБ - это момент конформации, начало которой имеет общее сходство, *во-первых*, с началом неконтролируемого деления клеток опухоли при ОГБ (см. главы 17 и 25), *во-вторых*, с началом неконтролируемого роста (экспансии) числа нуклеотидных повторов ДНК при БЭ (см. главу 27) и, *в-третьих*, с началом инфекционного процесса, пусть и контролируемого организмом, например, при вирусных заболеваниях.

В-четвертых, нельзя не отметить сходство феномена прионизации с появлением и последующим сохранением геномной памяти о патологической форме PrP^{Sc}, на основе которой бесконтрольно копируют-

ся новые копии PrP^{Sc}, приводя к манифестации (пороговый эффект), развитию ПБ и гибели организма.

Таким образом, ПБ, ОГБ, БЭ, БГП и инфекционный процесс имеют общие механизмы развития, связанные с началом патологического процесса в организме.

Немаловажное значение имеет отсутствие иммунного ответа на «прионную инфекцию» в случае губчатых энцефалопатий, что, скорее всего, объясняется наличием в клетках и

тканях (включая Т- и В-лимфоциты) нормальной формы PrP^c, а иммунные клетки организма не распознают конформационно отличающуюся от нее патологическую форму PrP^{Sc}, принимая ее за нормальную форму.

Основные признаки ПБ

Основные признаки ПБ отличаются высокой вариабельностью неврологических расстройств. Для наследственных вариантов ПБ характерно проявление признаков в возрасте 45-75 лет и быстро прогрессирующее течение, приводящее к преждевременной смерти.

Наиболее выражены: атаксия, парезы и параличи, прогрессирующая деменция, снижение остроты зрения, эпилептические приступы. Для фатальной инсомнии, кроме того, характерны: гипертермия, дезориентация в пространстве и времени, нарушение ритмов сна и бодрствования.

ОТДЕЛЬНЫЕ НОЗОЛОГИИ

Болезнь Крейтцфельда-Якоба

Выделяют основной (панэнцефалический) I тип и дополнительный II тип болезни.

Клинические признаки при панэнцефалическом типе: выраженные неврологические нарушения в виде нарастающей диспраксии, нейродегенеративного регресса, прогрессирующей деменции и другой симптоматики вплоть до постановки диагнозов атипичной деменции, болезни Альцгеймера, Паркинсона, Пика, миоклонусэпилепсии, хореи Гентингтона (см. ниже).

Манифестация I типа болезни начинается в возрасте 20-50 лет с нарушения походки, затрудненного глотания, миоклоний, повышения тонуса и рефлексов, далее развиваются прогрессирующая деменция и нейродегенеративный регресс, нарастает диспраксия,

постепенно утрачиваются навыки чтения, письма и счета. На ЭЭГ выявляется спайк-волна, а на ЭНМГ - электрофизиологическая картина демиелинизации. При патоморфологических исследованиях обнаруживается спонгиозная дегенерация ЦНС, фокальный или диффузный глиоз.

Для II типа болезни характерны тот же возраст манифестации и прогрессирующая деменция. Продолжительность жизни от момента появления первых симптомов - не более 2 лет. Основные признаки: апатия, депрессия, миоклонии мышц шеи и скелетной мускулатуры, мозжечковые нарушения в виде атаксии и тремора, нарушения глотания, сна и произношения звуков, повышение рефлексов с выявлением патологических стопных знаков, поражение бульбарной группы черепно-мозговых нервов, проксимальные мышечные атрофии со снижением всех видов чувствительности, ригидность мышц, супрануклеарная офтальмоплегия, тики, фасцикуляции, хореитические гиперкинезы, эмоциональная лабильность.

При электрофизиологическом исследовании обнаруживаются: низкая активность на ЭЭГ, снижение скорости проведения нервных импульсов по двигательным волокнам на ЭНМГ, переднероговая активность при ЭМГ. При патоморфологическом исследовании выявляются: спонгиозная дегенерация (полости, кисты) во фронтальной области коры, стриатуме и таламусе, а также генерализованная церебральная атрофия и кальцинаты в базальных ганглиях. Кроме того, в мозге обнаруживаются амилоидоподобные бляшки, характерные для болезни куру.

При болезни Крейтцфельда-Якоба идентифицировано 11 точковых мутаций (замены одного нуклеотида на другой) с образованием аллельных вариантов гена PRNP, в том числе вариантов тандемных октапептидных кодирующих повторов, расположенных между кодонами 51 и 91, в связи с чем патологию называют болезнью октапептидных кодирующих повторов. Тип наследования аутосомнодоминантный.

Болезнь Герстмана-Штреусслера, или прионная болезнь 3 типа

Болезнь Герстмана-Штреусслера, или прионная болезнь 3 типа, плохо диагностируется.

Характеризуется возрастом манифестации 20-50 лет. В этот период у больных начинает прогрессировать интеллектуальная недо-

статочность, мозжечковая атаксия, дизартрия, миоклонии мышц нёба и скелетных мышц, супрануклеарная офтальмоплегия, нистагм, спастичность, хореитические гиперкинезы, гиперестезия, полинейропатия, парестезии.

При морфологическом исследовании выявляются: спонгиозная дегенерация ЦНС, глиоз, амилоидные включения и нейрофибриллярные клубочки.

Генетически выделяют пять аллельных вариантов, связанных с заменой тимина на цитозин.

Болезнь телец Леви

Болезнь телец Леви, или паркинсонизм, сочетающийся с деменцией и клиническими проявлениями, сходными с таковыми при болезни Паркинсона. Возраст манифестации - 10 лет и старше.

В неврологическом статусе: атрофии мышц конечностей, галлюцинации, нарастающая дисфагия, ортостатическая гипотензия и/или гипертензионные кризы, прогрессирующая деменция, ригидность, спастичность, тремор, туловищная атаксия, фасцикуляции.

При морфологическом исследовании в субкортикальных областях мозга обнаруживаются тельца Леви.

В основе болезни лежит точковая мутация MET232ARG, обуславливающая появление конформационной формы прионного белка: мет232арг (M232R-мутация). Описан также один больной, у которого наблюдалась комбинация этой мутации с мутацией V180I.

Синдром Стила-Рихардсона-Олсцевски

Синдром Стила-Рихардсона-Олсцевски, или прогрессирующий супрануклеарный паралич (субкортикальный глиоз PSP1), манифестирует в возрасте 20-50 лет с нарушений речи, затем проявляются: агрессивное поведение, брадикинезия, деменция, диспраксия, дисфагия, миоклонии, мозжечковая атаксия, мышечная спастичность и ригидность, нарастающая акинезия, нистагм, супрануклеарная офтальмоплегия, тремор, хореитические гиперкинезы, эмоциональная лабильность.

При морфологическом исследовании выявляются неспецифические изменения в головном и спинном мозге и внутриклеточные включения в виде нейрофибриллярных клубочков или аргирофильных включений Пика и телец Леви.

Болезнь Пика

Болезнь или деменция Пика трудно диагностируется. Манифестирует в возрасте 20-50 лет с нарушений речи, сопровождается апатией и/или депрессией, нейродегенеративным регрессом и прогрессирующей деменцией.

При морфологическом исследовании выявляются: генерализованная или локальная (фронтальная или темпоральная) атрофия коры мозга, спонгиозная дегенерация, глиоз и внутриклеточные включения в виде нейрофибриллярных клубочков (аргирофильные включения).

Болезнь Куру

Болезнь Куру, или «смеющаяся болезнь» выделена в племени каннибалов, населяющих джунгли Новой Гвинеи. Характеризуется прогрессирующей дегенерацией нервных клеток, участвующих в формировании двигательного центра головного мозга. В результате спонгиозматозных нарушений изменяется контроль за мышечной активностью, развивается тремор туловища, конечностей и головы. Болеют преимущественно женщины и дети. Смерть наступает через 9-12 мес.

Семейная фатальная инсомния

Впервые описана в 1979 г. И. Ройтером, который наблюдал смерть от бессонницы двух родственников своей жены. Всего в мире насчитывается 28 семей с этим заболеванием.

Болезнь дебютирует в возрасте 30-60 лет. Клинически выделяют 4 периода течения: *первый период* (длится 4 мес): больной начинает страдать от бессонницы, появляются приступы панических атак, фобии; *второй период* (5 мес): панические атаки учащаются, присоединяются галлюцинации; *третий период* (3 мес): развивается полная бессонница, больной теряет в весе; *четвертый период* (6 мес): пациент перестает говорить, не реагирует на окружающих, у него постепенно развивается коматозное состояние и наступает смерть.

Продолжительность жизни от момента манифестации: 7 мес - 3 года.

При морфологическом исследовании обнаруживается дегенерация в ядрах таламуса.

В 1990 г. при этом заболевании впервые удалось идентифицировать точковую мутацию, наследуемую по аутосомно-доминантному типу.

Мутация в кодоне 178 гена PRNP проявляется заменой аспарагина на аспарагиновую кислоту в конформационной форме прионного белка, что вызывает появление в таламусе амилоидных бляшек и соответствующей симптоматики - бессонницы.

Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера, или старческое слабоумие - самостоятельное наследственное заболевание, обусловленное точковыми мутациями в генах, локализованных в локусах разных хромосом: 1q31-q42 - ген PS1, 17q11.2 - ген PS2, 19q13.2 - ген PS3 и 21q21.3-q22.05 - ген PS4, т.е. всего 4 генокопии болезни (см. главы 4, 9, 10 и 13).

Болезнь Альцгеймера проявляется в возрасте 20-50 лет акинезией, генерализованными судорожными приступами, дисfazией (афазией), миоклониями (в том числе мышц мягкого нёба), нарастающей мышечной ригидностью, прогрессирующей деменцией, тремором. В дальнейшем присоединяется старческое слабоумие.

При морфологических исследованиях выявляются генерализованная атрофия мозга, клубочки нейрофибрилл, сенильные бляшки (тельца Хирано) и тельца Леви.

Как установлено, при болезни Альцгеймера в головном мозге снижается активность фосфолипаз - это вынужденная компенсация в ответ на снижение скорости потери фосфолипидов. Наблюдаемые при этом рост количества глицерофосфорилхолина и увеличение активности лизофосфолипид-ацетилтрансферазы тесно связаны с изменением метаболизма холин-содержащих фосфолипидов и участием в этих реакциях амилоидных пептидов, что позволяет рассматривать болезнь Альцгеймера как прионное заболевание. Целесообразность рассмотрения этого заболевания в группе ПБ подтверждается выделением у одного больного с болезнью Альцгеймера точковой мутации MET129VAL, которая связана с заменой аденина на гуанин в первом нуклеотиде кодона 129 гена PRNP, что обуславливает появление конформационной формы прионного белка: мет129вал (M129^мутация); были выделены ее гомо- и гетерозиготные состояния по аллелям: met129 и val / met129.

Подходы к диагностике

Для диагностики ПБ в качестве биологического материала используется ткань из соскоба миндалевидных желез человека, в которой

после обработки протеинкиназой K выявляется протеазоустойчивый фрагмент PrP^{Sc} с молекулярной массой 27-30 кДа.

В случае губчатых энцефалопатий для диагностики применяется метод циклической амплификации, позволяющий выявить патологическую форму PrP^{Sc} в тканях и биологических жидкостях человека на ранних стадиях развития болезни.

Подходы к лечению

ПБ считаются неизлечимыми. Их терапия - в основном симптоматическая, и подходы к радикальной терапии только начинают разрабатываться.

В последние годы появились предпосылки к лечению ПБ антителами.

Например, *in vitro* показано, что антитела против некоторых эпитопов PrP ингибируют размножение патологической формы PrP^{Sc}. В связи с этим было продемонстрировано, что вакцинация рекомбинантными PrP (перед или сразу после инфицирования) и пассивная иммунизация антителами против эпитопов PrP приводили к подавлению экспрессии прионного гена, что подтверждало обоснованность вмешательства в иммунную систему как способа лечения. Было также предположено, что размножение конформационной формы PrP^{Sc} можно остановить с помощью блокаторов «в-структур» или пептидов, обогащенных пролином и имеющих гомологию с нормальной формой PrP^C. С этой целью был разработан второй подход, основанный на полиморфизме гена PRNP и учитывающий, что мутации в этом гене могут блокировать образование патологической формы PrP^{Sc}.

Третий подход основан на использовании дрожжей в качестве модели для поиска и изучения факторов, способных излечивать клетки от прионов (изгонять их).

Дрожжи как модель использовались для поиска соединений, «изгоняющих» из клеток такие прионы, как, например, PSI⁺ и URE3. В частности, проверили 2500 химических соединений и выделили 6 соединений, элиминирующих PSI⁺, в том числе 5 принадлежали к новому классу молекул - кастеллопаолитинам, а шестым был фенантридин - они «изгоняли» URE3 и ингибировали образование PrP^{Sc} в культуре клеток нейробластомы мыши.

Кроме того, изучены два соединения, антиприонная активность которых проявлялась в культуре клеток млекопитающих: кинакрин

(используется для лечения малярии) и хлорпромазин (антипсихотическое средство). Соединения излечивали клетки дрожжей от PSI+

и URE3.

В целом показано: кастеллопаолитины, кинакрин, фенантридин и хлорпромазин действуют не на прионные агрегаты, а на механизмы, поддерживающие конформационное патологическое состояние прионных белков.

Следует заключить, что открытие в середине XX в. белков-прионов и ПБ существенно расширило представления о нетрадиционных вариантах наследования генов и признаков, выявило новые механизмы развития инфекционного процесса. Белки-прионы представляют собой важное общебиологическое явление, тесно связанное с эпигеномной регуляцией генной активности в клетках человека. В пользу существования такого механизма свидетельствуют данные о том, что у низших эукариот феномен прионизации лежит в основе эпигенетической наследственности и регуляции экспрессии генов на посттрансляционном уровне.

Кроме того, механизм конформации прионного белка из нормальной формы в патологическую значительно отличается от механизмов генетической изменчивости. В частности, переход таких белков в патологическое состояние может происходить с более высокой частотой, чем, например, возникновение мутаций (см. главу 5). При этом степень выраженности прионного фенотипа может зависеть от варианта приона.

Обратный переход из прионного состояния в неприонное также происходит чаще, чем реверсии в ходе мутационного процесса, поскольку клетки с прионным фенотипом сохраняют информацию об исходном состоянии белка. Последнее наблюдение особенно важно для понимания адаптивной лабильности популяции, когда в ответ на изменение условий окружающей среды в первую очередь требуется временная коррекция фенотипа, а не постоянное его изменение, напоминающее гомеорез (см. главу 12).

Принимая во внимание распространенность и значимость прионов у низших эукариот, можно полагать, что у высших эукариот прионы могут не только становиться причиной болезни, но и способствовать выполнению других физиологических функций. Так, например, были продемонстрированы прионоподобные свойства нейрональной изоформы белка CREB у улитки *Aplysia californica*. В этом случае агрегированное активное состояние CREB наследуется доминантно

и передается с цитоплазмой, а уровень CREB значительно возрастает в присутствии медиатора - серотонина, принимающего участие в синаптической пластичности процессов обучения и памяти у человека. При этом механизм передачи сигнала, включающий прионный переход белка CREB, имеет преимущество, поскольку при достижении прионного состояния оно поддерживается без стимуляции за счет «хранения» ранее поступившего импульса. Поэтому вполне возможно существование белков-прионов, вовлеченных в процессы обучения и памяти.

Таким образом, первоначально открытые как инфекционные агенты, белки-прионы имеют огромное общебиологическое значение, являясь носителями биологической информации нового типа, хранимой в механизме конформации белка.

ГЛАВА 30 ПРОФИЛАКТИКА НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

Роль и место профилактики наследственной патологии в медицине

С 1990 г. в течение всех последующих лет ухудшалось благосостояние российских граждан и соответственно ухудшались показатели общего здоровья населения, особенно детей. В расчете на 1000 населения в 2,5-3 раза упала рождаемость (до 8,6-10 человек) и в 2 раза выросла младенческая смертность: до 20-23,4% против 9-11% в развитых странах; в 4-20 раз выше нормальных значений вырос уровень общей детской смертности.

Необходимо признать, что значительную часть общей заболеваемости и смертности населения разных стран обуславливает наследственная патология. Огромное медицинское и социальное значение груза наследственной патологии (см. главу 17) состоит в том, что около 40% коечного фонда педиатрических клиник мира занимают больные с такой патологией, а структура общей смертности детей до 5 лет свидетельствует: из-за наследственной патологии умирает каждый второй ребенок.

В России каждый девятый-десятый новорожденный имеет такую патологию, в том числе 4,2-6,5% детей рождаются с генными болезнями, 2,5-3,5% детей - с ВПР, около 1% - с хромосомными синдромами и почти 1,5% - с МФЗ.

Больные с наследственной патологией требуют частой и продолжительной госпитализации, среди них много социально неприспособленных детей-инвалидов, нуждающихся в постоянной заботе и благотворительной помощи. О медицинской и социальной значимости груза наследственной патологии, огромных финансовых затратах, связанных с вынашиванием патологической беременности, рождением и медицинским обслуживанием детей-инвалидов, оказанием им и их семьям материальной и социальной поддержки можно судить по данным Минздравсоцразвития России, подготовленным на начало

2000 года (табл. 19).

Таблица 19. Груз больных с инвалидизирующей наследственной патологией и затраты, связанные с их медицинским и социальным обслуживанием в России

Численность населения	10 млн чел.
Показатель рождаемости на 1000 населения	9,0 чел.
Ежегодно рождается детей	90 тыс. чел.
Частота рождений детей с инвалидизирующими болезнями (%), в том числе:	
пороками развития	3,0
хромосомными болезнями	0,3
моногенными болезнями	0,7*
Ежегодно рождается детей с инвалидизирующими болезнями	3600 чел.
Средняя продолжительность жизни таких больных	45 лет
Общее количество больных с инвалидизирующими наследственными и врожденными болезнями	162 тыс. чел.

Затраты на обслуживание 3600 беременных и рожениц, в том числе:	
мониторинг, декретный отпуск (3600 $\times$ 10 000 руб.)	36,0 млн руб
лечение гестозов и других осложнений у 50% беременных (1800 $\times$ 15 000 руб.)	27,0 млн руб
родовспоможение (3600 $\times$ 20 000 руб.)	72,0 млн руб
хирургическая помощь детям с ВПР (900 $\times$ 45 000 руб.)	40,5 млн руб
другие виды лечения детей (2500 $\times$ 15 000 руб.)	37,5 млн руб
Итого:	213 млн руб
Затраты на социальную помощь, в том числе:	
на 1 инвалида в год	20-25 тыс. руб.
на 162 000 больных в год	4,0 млрд руб.

Примечание. * - данные в 4 раза занижены по сравнению с экспертными оценками ВОЗ. Другие разъяснения содержатся в тексте.

Как следует из данных этой таблицы, в России в расчете на 10 млн населения общее количество больных с инвалидизирующими заболеваниями составляет 162 тыс. человек (1,62%), ежегодно рождается еще 3600 таких больных. Общие затраты на медицинское обслуживание женщин, родивших этих детей, включая мониторинг в ходе беременности, декретный отпуск, лечение токсикозов, родовспоможение,

хирургическую помощь детям с ВПР и другие медицинские услуги, достигают 213 млн руб. в год, а общие затраты на социальную помощь детям-инвалидам и всем нуждающимся в такой помощи больным составляют 4 млрд руб. в год.

Если вспомнить, что указанные объемы затрат надо умножить на 14,3 (в России проживают 143 млн человек), то вполне очевидна необходимость постоянного внимания государства и органов здравоохранения и социальной защиты к укреплению и сохранению здоровья граждан и снижению указанных затрат. Безусловно, что главное место в проводимых на государственном уровне мероприятиях должна занять медикогенетическая профилактика или предупреждение рождения детей с наследственной патологией. Такая профилактика остается самым эффективным способом охраны геномного, протеомного и репродуктивного здоровья человека и генофонда человечества в целом.

В то же время в молекулярной медицине достигнуты определенные успехи по этиологической и патогенетической коррекции ряда МВ и МФЗ (см. главу 20). Но это только начало пути, и в ближайшие два-три десятилетия пока преждевременно говорить о применении медициной методов радикальной терапии наследственной патологии. Поэтому врачи по-прежнему применяют малоэффективные методы симптоматической или заместительной терапии. Вечный вопрос «Что делать?» сегодня решается медициной путем внедрения обязательных для применения врачами мероприятий по предупреждению развития наследственной патологии среди населения.

Главное внимание уделяется предупреждению проявления в последующих поколениях людей вновь возникающих мутаций, заболеваний, унаследованных от предыдущих поколений, и заболеваний, развивающихся на основе наследственной предрасположенности и отрицательного действия факторов внешней среды.

Основные направления и подходы

Выделяют два направления профилактики: генотипическое и фенотипическое. В рамках каждого направления имеются свои подходы.

Генотипическое направление

Генотипическое направление включает комплекс мероприятий по предотвращению передачи патологического гена или хромосомной мутации в ряду поколений. В числе подходов этого направления:

- планирование семьи на основе МГК (направлено на ограничение деторождения среди носителей мутаций);
- искусственная внутриутробная элиминация аномального эмбриона и плода с помощью программы пренатальной (дородовой) диагностики;
- устранение факторов возникновения новых мутаций (экологогенетический подход);
- направленная коррекция патологического гена с помощью генотерапии (см. главу 20).

Рассмотрим основные подходы этого направления.

Первый подход является базовым видом профилактики - это МГК больных пробандов и членов их семей, отягощенных наследственной патологией (см. ниже).

Значительное продвижение в генотипическом направлении связано с созданием и внедрением программы ПД - это второй подход. Такая диагностика нацелена на внутриутробную оценку наследственного материала и фенотипа эмбриона и плода. Она основана на выявлении эмбрионов и плодов, имеющих генные, хромосомные и геномные мутации и/или ВПР. С этой целью применяется общая программа дородового обследования беременных, порядок проведения которой включает три обязательных их обращения в женскую консультацию, центр планирования семьи и репродукции или медико-генетическую консультацию.

- Первое обращение - в 6-12 нед беременности. Проводят физикальное, гинекологическое и клинико-лабораторное обследования, УЗИ (для беременных, поставленных на учет в женской или медико-генетической консультации), инвазивную диагностику по показаниям (биопсия хориона с последующим генетическим анализом клеток плода) для беременных в возрасте 35 лет и старше, а также в случаях семейного носительства генной, хромосомной или геномной мутации.
- Второе обращение - в 14-20 нед беременности. Проводят физикальное и клинико-лабораторное обследования, УЗИ (для всех беременных), скрининг на сывороточные маркеры ряда ВПР и хромосомных синдромов, инвазивную диагностику по показаниям (биопсия хориона, биопсия плаценты, кордоцентез, амниоцентез) с последующим генетическим анализом клеток плода.
- Третье обращение - в 26-32 нед беременности. Проводят физикальное и клинико-лабораторное обследование, УЗИ (для всех беременных), инвазивную диагностику по показаниям с последующим генетическим анализом клеток плода.

Таким образом, по программе ПД применяется обязательная триада методов: УЗИ плода, скрининг на сывороточные маркеры и инвазивная диагностика с последующим генетическим анализом клеток плода. С их помощью можно с высокой точностью

поставить диагноз и предотвратить рождение больного ребенка с БАР и МАР (65-70% случаев), хромосомными синдромами (80-85%) и МБ (более 50 нозологий).

Третий подход - это эколого-генетический подход, предусматривающий создание и внедрение системы, снижающей или полностью устраняющей воздействие на генотип организма человека факторов окружающей среды. Этот подход включает токсико-гигиеническое нормирование технологических процессов и продуктов их производства, контроль за распространенностью и использованием химических соединений, лекарственных препаратов, генетически модифицированных продуктов, пищевых добавок и других агентов (с обязательной проверкой на канцерогенную, мутагенную и тератогенную активность), а также создание специальных препаратов - антимутагенов.

Четвертый подход - это генно-инженерная коррекция патологического гена. Этот подход для большинства стран пока не вполне доступен, хотя и имеет определенные перспективы (см. главу 20).

Фенотипическое направление

Фенотипическое направление профилактики включает комплекс мероприятий, способствующих предупреждению развития симптомов и осложнений болезни, снижению ее тяжести; этиологический фактор не устраняется. В числе подходов этого направления выделяют профилактическое патогенетическое лечение - это первый подход, включающий ограничение или исключение определенных веществ из рациона питания, например, при галактоземии, гистидинемии, ФКУ и целиакии; добавление определенных веществ к рациону питания (АГС, оротикоацидурия и др.); возмещение несинтезируемых организмом веществ (гемофилия, сахарный диабет и др.). Следует отметить, что во многих странах профилактическое патогенетическое лечение является одним из самых реализуемых подходов. В них оно введено начиная с 1984 г. и базируется на массовом неонатальном скрининге («просеивании») на НБО биологического материала, полученного от новорожденных (см. главу 19).

В частности, за рубежом в числе скринируемых наследственных заболеваний находятся до 300 нозологий, включая: муковисцидоз

(частота в популяции 1 случай на 1,5-2 тыс. рождений); врожденный гипотиреоз (1:4,7-5000); недостаточность альфа-1-антитрипсина (1:5000); ФКУ (1:10000); гистидинемия (1:23 000); галактоземия (1:35-50000); лейциноз (1:90-120000); аргинин-янтарная ацидурия (1:300000); тирозинемия (1:900000); недостаточность аденозиндезаминазы (1:1 500000). В России тотальный неонатальный скрининг проводится только на пять НБО: АГС, врожденный гипотиреоз, галактоземия, муковисцидоз и ФКУ.

Второй подход - это устранение условий и факторов, способствующих экспрессии патологического гена (дефицит глюкозо-6- фосфатдегидрогеназы, порфирия и др.).

В России этот подход не нашел применения.

Третий подход - это периконцепционная профилактика врожденных болезней мультифакториальной природы. Цель такой профилактики - обеспечение оптимальных условий для созревания гамет, их оплодотворения, образования зиготы и зародышевых клеток, имплантации зародыша в слизистую оболочку матки и раннего развития зародыша.

Основные положения периконцепционной профилактики.

- Беременность не должна быть случайной, она должна планироваться.

- За 3-4 мес до зачатия супруги должны убедиться в хорошем состоянии своего психического и соматического здоровья и нормальной репродуктивной функции. С этой целью супруги заблаговременно проходят обследование у врачей-специалистов, задачей которых являются выявление и санация андрологической, гинекологической, психической и соматической патологии, а также выявление скрытых очагов инфекций, передаваемых половым путем.

- За 2-3 мес до зачатия супруги проходят обязательное профилактическое лечение с применением препаратов поливитаминного комплекса на основе витаминов группы В и фолиевой кислоты, а также соблюдают режим сбалансированного питания, обогащенного продуктами с повышенным содержанием фолиевой кислоты: бобы, печень и почки крупного и мелкого рогатого скота, помидоры, шпинаты и др. У супруги такое лечение продолжается в течение I триместра беременности, а у супруга прекращается после зачатия. Считается, что такое комплексное лечение оптимизирует клеточный метаболизм, включая метаболизм зароды-

- шевых клеток, способствует созданию оптимальных условий для имплантации зиготы и развития эмбриона и плода. При наступлении беременности супруга продолжает наблюдаться врачами и проходит обследование по приведенной выше программе дородовой диагностики. Основные показания для периконцепционной профилактики следующие.

1. Наличие в семье риска развития ВПР, включая анэнцефалию, атрезии, дефекты нервной трубки, пороки сердца, расщелины губы и/или нёба и другие пороки мультифакториальной природы.

2. Случаи привычного невынашивания беременности или рождения детей со ЗВУР или врожденной гипотрофией.

3. Сахарный диабет и другие эндокринопатии у супругов.

4. Хроническая соматическая патология у одного из супругов.

5. Профессиональные вредности у одного из супругов или его контакт на производстве с загрязнителями, подпадающими под токсикогигиеническое нормирование.

С молекулярно-генетических позиций, периконцепционная профилактика - это попытка устранить условия и факторы, способствующие экспрессии патологических генов, а также повлиять на аддитивное (суммарное) действие генетических факторов и факторов окружающей среды, т.е. противостоять такому действию.

Молекулярные механизмы периконцепционного профилактического лечения до конца не ясны. Полагают, что действующим началом является фолиевая кислота (возможно, весь комплекс витаминов группы В), которая функционирует как кофактор ферментов, участвующих в биосинтезе нуклеиновых кислот. Фолиевая кислота включается в процесс доставки метиловых групп в цикл метилирования, который превращает гомоцистин в метионин (донор метильной группы).

Доказано, что многие витамины группы В (В₆, В₁₂) и сама фолиевая кислота взаимодействуют как друг с другом, так и с другими компонентами в ходе самых разных метаболических преобразований (путей). В России этот подход также не нашел применения, хотя он не требует больших финансовых затрат.

Основные виды и методы профилактики

Медико -генетическое консультирование

Первые упоминания о попытках не вполне осознанного вмешательства в генофонд человека относятся к глубокой древности.

Например, в древнегреческой Спарте пригодность новорожденных младенцев мужского пола к несению ими в дальнейшем воинской службы определялась выявлением у них каких-либо дефектов развития и в случае обнаружения последних младенцы сбрасывались со скалы. Таким образом, с помощью искусственного отбора уничтожался патологический генотип и фенотип, что не входило в противоречие с моралью существовавшего в Спарте рабовладельческого общества, хотя и не дало этому обществу ни одного выдающегося полководца.

На протяжении многих веков попытки МГК предпринимались в разных странах, и в первую очередь они касались вступающих в брак молодых людей. Например, в баварском городе Мюнхене в 1916 г. было подготовлено письменное обращение к таким молодым людям: «Тот, кто заключает брак, не разузнав, здоров он или болен, берет на себя большую ответственность не только перед своим супругом, но и перед потомством...».

В России первая медико-генетическая консультация была организована Сергеем Николаевичем Давиденковым в 1929 г. в возглавляемом им Институте нервно-психической профилактики. За рубежом, однако, считают, что система медико-генетической профилактики была впервые предложена Шелдоном Ридом в 1947 г., определившим ее как социальную службу помощи наследственно отягощенным семьям. В 1950 г. этим автором было опубликовано краткое руководство по генетическому консультированию. Первые медико-генетические консультации в условиях клинических учреждений зарубежных стран стали проводиться в американском штате Мичиган в 1940 г.

В настоящее время в мире насчитывается около 3000 медикогенетических консультаций.

Организация медико-генетической службы в России описана в Приложении II.

Рассмотрим основные ситуации и связанные с ними способы и показания к МГК.

Первая ситуация возникает, когда диагноз наследственного заболевания поставлен или известен из родословной семьи. При этом возможны два способа консультирования.

- В семье планируется рождение ребенка, и супруги хотят знать, каковы риск появления наследственной патологии и прогноз здоровья у будущего потомства - это *проспективное консультирование* (до наступления беременности или на ранних ее сроках).

Проспективное консультирование (как наиболее прогрессивное) проводится: при наличии кровного родства между супругами (например, браки между кузенами), неблагоприятном семейном анамнезе (болезни с поздним дебютом, психические и соматические заболевания), экзогенном воздействии вредных факторов (облучение, прием лекарств, профессиональные вредности, тяжелые инфекции).

- В семье родился больной ребенок, и родители хотят знать, каковы прогноз его здоровья и риск появления этой болезни у последующих детей - это *ретроспективное консультирование* (после рождения больного ребенка).

Вторая ситуация возникает как один из вариантов ретроспективного консультирования при первой ситуации: в родословной семье имеется заболевание, но наследственный дефект только подозревается, и для уточнения диагноза требуется применение генетических методов исследования. Дополнительными показаниями для МГК являются: наличие аналогичных заболеваний или симптомов болезни у нескольких родственников в

одной семейной родословной; отставание ребенка в физическом и умственном развитии; наличие БАР и МАР в сочетании с низким ростом, судорогами и другими симптомами; первичная аменорея у супруги и первичное бесплодие у одного из супругов (особенно в сочетании с недоразвитием вторичных половых признаков); привычное невынашивание беременности; непереносимость пищевых продуктов и лекарственных препаратов; неблагоприятное течение беременности: ЗВУР плода, многоводие, угроза выкидыша.

Задачами МГК являются: постановка точного диагноза болезни, определение типа ее наследования и величины риска повторного появления данной патологии в семье, объяснение смысла генетического прогноза консультирующемуся пробанду, пропаганда медикогенетических знаний.

МГК проводится в три этапа. *Первый этап* - диагностика болезни. Врачу-консультанту важно убедиться, что диагноз наследственного или врожденного заболевания поставлен с максимальной точностью и полностью собраны клинико-генеалогические данные.

С этой целью проверяются полнота и исчерпывающий характер полученных данных, тщательно осматриваются все члены пораженной семьи. Такие меры необходимы для выявления у родственников больного пробанда симптоматики, нередко у него отсутствующей,

а также для того, чтобы исключить стертые и начальные формы болезни при выявлении доминантно наследуемых форм с низкой экспрессивностью или подозрении на новую мутацию. В случае необходимости применяются дополнительные методы обследования больного и его родственников. *Второй этап* - определение варианта и типа наследования болезни. Проводится на основе критериев наследования генов и признаков, изложенных в главе 4. *Третий этап* - оценка генетического риска болезни (прогноз потомства). Более подробно остановимся на этом этапе.

Оценка генетического риска наследственной патологии

Генетический риск выражает вероятность появления наследственной патологии у консультирующегося пробанда и его потомства. Риск оценивается по следующим критериям: *низкий риск* (если риск не достигает 5%, то противопоказаний к деторождению нет); *средний риск* (если риск равен 6-20%, то рекомендации по планированию семьи зависят от его величины и тяжести медицинских и социальных последствий болезни, а также возможности проведения пренатальной диагностики); *высокий риск* (если риск выше 20%, то не рекомендуется дальнейшее деторождение в данной семье без обязательного применения методов ПД).

Способы определения и типы генетического риска

Существуют следующие способы определения и типы генетического риска болезни.

- Теоретические расчеты, основанные на генетических закономерностях (расчеты менделевского риска). Такие расчеты применяются, если четко установлено моногенное наследование болезни.
- Эмпирические данные, основанные на фактических наблюдениях (эмпирический риск). Данные таблиц эмпирического риска используются для анализа большинства МФБ и хромосомных синдромов.
- Модифицированный генетический риск. Определение такого риска основано на том, что априорный менделевский риск может изменяться за счет дополнительных факторов. Например, при хорее Гентингтона, являющейся аутосомно-доминантным заболеванием с

полной пенетрантностью, риск для сына мужчины, отец которого (дед консультирующегося пробанда) болел этим заболеванием, отсутствует, если сам мужчина не болел этим заболеванием и дожил до преклонного возраста, хотя при этом он

- имел высокий риск, равный 50%. Иными словами, в этом случае риск снижается по мере увеличения возраста здорового отца. Риск, оцениваемый по независимым данным. Определение такого риска основано на методах расчета, позволяющего снизить оценку теоретического (менделевского) риска. Например, при Х-сцепленной рецессивной миодистрофии Дюшенна-Беккера определение гетерозиготного носительства патологического гена у женщины до рождения ею ребенка позволяет оценить риск как 50% для ее будущего сына и отсутствие риска для ее будущей дочери, которая, однако, будет гетерозиготной носительницей патологического гена с вероятностью 50%.

Особенности консультирования при разных вариантах наследования

При консультировании МБ все ситуации можно условно разделить на три группы: генотипы родителей известны; генотипы определяются с большой долей вероятности; генотипы неизвестны. При этом первую и вторую группы можно рассматривать вместе, если при анализе родословной выявлен моногенный вариант наследования и установлены генотипы обоих родителей. Отдельно в первой группе оценка риска сводится к анализу простого менделевского наследования. Отдельно во второй группе вычисляется вероятность гетерозиготного носительства с учетом степени родства с больным пробандом, когда речь идет не о самих супругах, а о родственниках пробанда. Если во второй группе оценивается риск для сибсов (в случае новой мутации у больного пробанда), то вводятся данные о популяционной частоте мутирования (равна $2m$), и величина повторного риска вычисляется по типам образующихся гамет исходя из частот появления возможных потомков. Отдельно в третьей группе (с неизвестными генотипами родителей) оценка риска проводится на основе определения вероятности принадлежности родителей к генотипам, с помощью которых можно было бы объяснить характер распределения заболевания и причины состояния здоровья уже родившихся детей.

В случае аутосомно-доминантного заболевания риск рождения больного ребенка, если болен один из родителей, равен 50% (см. главу 4). При этом важное значение имеют: поздний и варьирующий возраст манифестации заболевания, неполная пенетрантность и варьирующая экспрессивность. В случае аутосомно-рецессивного заболевания самая большая трудность состоит в том, чтобы убедиться, что это именно такой тип наследования. Обычно

анализируется изолированный случай при полном отсутствии генеалогических данных, т.е. только на основании одного диагноза. Для оценки генетического риска имеет значение кровное родство, которое подразумевает, но не доказывает аутосомно-рецессивный тип наследования. Риск рождения больного ребенка равен 25% (см. главу 4), а в случае кровно-родственных браков между родителями больного пробанда в родословной наблюдается увеличение числа таких больных. Важно также иметь в виду генетическую гетерогенность в случае вступления в брак двух больных индивидов (например, возможность рождения здорового ребенка в семье глухонемых).

При консультировании по поводу Х-сцепленных заболеваний часто довольно трудно определить, новая это мутация или мать больного ребенка является носителем патологического гена. Вместе с тем, в случае Х-сцепленного доминантного заболевания у больного отца все дочери будут больны, а сыновья - здоровы; у больной матери равновероятно рождение больной дочери или больного сына; больные женщины будут встречаться в два раза чаще, чем больные мужчины. В свою очередь, в случае Х-сцепленного рецессивного заболевания больными являются мужчины-родственники

больного пробанда по материнской линии; у больного отца все дочери будут здоровы и будут гетерозиготными носителями патологического гена.

Кроме того, в случае когда женщина является гетерозиготным носителем патологического гена, то половина ее сыновей будут больны, а все дочери - здоровы, при этом половина дочерей будут гетерозиготными носителями патологического гена.

При консультировании по поводу МФЗ обоснованный прогноз можно получить с помощью таблиц эмпирического риска, которые служат основой консультирования, хотя они и не столь универсальны для разных популяционных групп.

При таком консультировании степень риска зависит не только от правильности диагноза, но и от критериев, характерных для полигенного наследования (см. главу 4). В их числе: связь с величиной коэффициента наследования болезни; степень родства консультирующегося пробанда с больным родственником; тяжесть течения болезни; редко поражаемый пол; число больных родственников.

При консультировании хромосомных синдромов определение риска проводится с помощью таблиц эмпирического риска, где учитываются: семейные формы структурных перестроек хромосом, хро-

мосомный мозаицизм у одного из родителей, возможность повторения анеуплоидии при нормальных кариотипах у родителей.

При консультировании врожденных болезней врачу-консультанту следует руководствоваться генетическими (негенетическими) причинами их развития (см. главу 23).

При консультировании болезней с нетрадиционным вариантом наследования следует руководствоваться данными, изложенными выше (подходы к диагностике и лечению таких заболеваний, см. главы 21, 26-29).

Особенности генетического заключения

В целях достижения полного понимания консультирующимся пробандом смысла заключения врача-генетика следует учитывать: все мотивы, которыми руководствуются консультирующиеся лица (моральные, экономические и др.), интеллектуальный и образовательный уровень консультирующихся лиц, психологический климат в семьях консультирующихся лиц. Окончательное решение по планированию деторождения принимает только само консультирующееся лицо и его семья.

Пренатальная диагностика

ПД наследственной патологии имеет принципиальное значение для МГК, ибо только она позволяет перейти от вероятного к однозначному прогнозу здоровья потомства в семьях с отягощенной наследственностью и принять своевременные меры по прерыванию беременности аномальным плодом.

Проведение ПД целесообразно, если: имеется вероятность рождения ребенка с тяжелым моногенным или хромосомным заболеванием, комплексом БАР и МАР; риск рождения больного ребенка выше риска осложнений ПД; в распоряжении врача имеются точные диагностические тесты и необходимое оборудование; имеется письменное информированное согласие семьи на прерывание беременности в случае, когда диагностируется аномальный плод. Выделяют абсолютные и относительные показания к проведению ПД.

Абсолютные и относительные показания

Абсолютными показаниями служат: гетерозиготное носительство патологического гена у обоих родителей при аутосомно-рецессивных заболеваниях или только у матери по генам, сцепленным с X-хромосомой; возраст женщины старше 35-40 лет; наличие у роди-

телей моногенного доминантно наследуемого заболевания; рождение в прошлом ребенка с синдромом Дауна или другой хромосомной перестройкой, дефектами нервной трубки и ВПР; структурная перестройка хромосом (особенно наличие сбалансированных транслокаций и инверсий) у одного из супругов; пренатально диагностируемые моногенные заболевания (при наличии ДНК-маркеров), включая: АГС, альфа- и бета-талассемию, болезнь Тея-Сакса, гемофилию А и В, гликогенозы, гликолипидозы, миодистрофию Дюшенна-Беккера, миотоническую дистрофию, МВ, мукополисахаридозы, недостаточность орнитинтранскарбамилазы, нейрофиброматоз I типа, ретинобластому, серповидноклеточную анемию, сцепленную с X-хромосомой УО (СМБ), ФКУ, хорею Гентингтона.

Относительными показаниями служат: врожденные и наследственные эндокринопатии у беременной (врожденный гипотиреоз, сахарный диабет); инфекционные заболевания, проявившиеся в критические периоды беременности; осложненное течение беременности (ЗВУР плода, маловодие, многоводие, угроза выкидыша); прием лекарственных препаратов с возможным мутагенным и тератогенным эффектом; проведение рентгенодиагностических процедур, воздействие других источников ионизирующего излучения во время беременности.

Методы ПД разнообразны. Их применение зависит от срока беременности. Они подразделяются на инвазивные (вмешательство внутри организма) и неинвазивные (без вмешательства внутри организма). К первым методам относятся: амниоцентез, биопсия хориона, внутриутробная терапия и хирургия плода, искусственное осеменение спермой донора, кордоцентез, преимплантационная диагностика, фетоамниоскопия, фетоскопия. Ко вторым методам относятся: определение биохимических и иммунохимических маркеров, преглиническая диагностика, УЗИ, электро(эхо)кардиография. При проведении инвазивных процедур обязательно присутствие врача-лаборанта-генетика, которому в дальнейшем предстоит исследовать полученный от больного биологический материал.

Инвазивные методы

Амниоцентез. Проводится на сроках беременности до 12 нед и в 16-18 нед.

Анализируются: амниотическая жидкость (биохимический анализ, исследование уровней альфа-фетопротеина (АФП), хорионического гонадотропина, эстриола и 17-оксипрогестерона), культура

клеток плода (кариотип плода, биохимическая диагностика, ДНК-диагностика).

Биопсия хориона. Проводится в 8-10 нед беременности. Анализируются клетки и ткани хориона. Исследуется все то же, что и при амниоцентезе, кроме АФП.

Следует отметить, что проведение амниоцентеза и биопсии хориона связано с наименьшим риском для плода. Например, в Северной Америке эти методы применяют примерно у 8% беременных, выявляя геномные нарушения (трисомии по хромосомам 3, 18 и 21, X- и Y-хромосомам), более 100 НБО (болезнь Тея-Сакса, галактоземия, гипофосфатазия, гликогенозы II, III и IV типов, лейциноз, метилмалоновая ацидемия, ТКИД, цитруллинэмия и др.).

Внутриутробная терапия и хирургия плода. Оба метода применяются во II триместре беременности. При их проведении осуществляется биопсия кожи плода (буллезный эпидермолиз) и биопсия плаценты. Кроме того, эти методы применяются для введения лекарственных препаратов и декомпрессии (при гидронефрозе и гидроцефалии плода).

Кордоцентез. Относится к старым и наиболее предпочтительным методам. Сущность метода состоит во взятии крови плода из сосудов пуповины под контролем УЗИ. Процедура кордоцентеза проводится на 20-22 нед беременности и может быть использована для внутриутробного лечения АГС.

Преимплантационная диагностика. Основана на возможностях экстракорпорального оплодотворения, суть которого заключается в оплодотворении яйцеклетки *in vitro*, получении зиготы на стадии 4 или 8 бластомеров, извлечении одного из бластомеров и замораживании остальных, получении ДНК и ее анализе на наличие генов конкретных наследственных заболеваний. В настоящее время возможна преимплантационная диагностика болезни Марфана (обусловлена мутацией в гене фибриллина) с использованием ПЦР с обратной транскрипцией (см. главу 19).

В случае нормальных результатов оставшиеся бластомеры размораживаются и помещаются в матку для дальнейшего развития беременности *in vivo*.

Неинвазивные методы

Определение маркеров. Сущность метода заключается в определении биохимических и иммунохимических маркеров: АФП, хорионического гонадотропина, 17-оксипрогестерона. Их концентрация в амнио-

тической жидкости плода и сыворотке крови беременной отражает состояние и развитие плода.

АФП - эмбриоспецифический белок, концентрация которого исследуется с целью выявления дефектов нервной трубки (анэнцефалия, *spina bifida*), дефектов передней брюшной стенки (отсутствие прямых мышц живота или синдром «кожи чернослива»), диагностики врожденного нефроза, омфалоцеле, поликистоза почек, пороков развития желудочно-кишечного тракта, а также синдрома Дауна (вместе с определением уровня супероксиддисмутазы). При пороках ЦНС концентрация АФП возрастает, при синдроме Дауна, наоборот, снижается. Широкий АФП-скрининг проводится в сроки 16-20 нед беременности.

В свою очередь, увеличение уровня хорионического гонадотропина указывает на угрозу прерывания беременности и синдром Дауна, уменьшение уровня эстриола - на синдром Дауна, а увеличение концентрации 17-оксипрогестерона свидетельствует о нарушении функции коры надпочечников (АГС).

Преклиническая диагностика. Подразумевает выявление гена заболевания до манифестации первых симптомов (например, в случаях диагностики альфа- и бета-талассемии). Основана на ДНК-диагностике (см. главу 19).

Ультразвуковое исследование (УЗИ) - это самый распространенный метод ПД или метод первоначального выбора, ибо УЗИ назначается всем беременным, а при инвазивных методах обязательно применяется для их контроля. В плановом порядке УЗИ проводится во II и III триместрах беременности: первое исследование - в 18-22 нед; второе исследование - в 25-29 нед; третье исследование - в 32-36 нед. Третье УЗИ проводится с целью выбора врачом тактики ведения родов при беременности аномальным плодом,

определения объема неотложной помощи больному ребенку после родов и решения вопроса о его переводе в отделение детской реанимации.

Кроме обязательных обследований, УЗИ может назначаться на сроках 12-14 нед беременности с целью внутриутробной диагностики дефектов нервной трубки, а в спорных случаях - в конце I триместра беременности.

С помощью УЗИ выявляются: агенезия желудка и почек, амелия, амниотические тяжи, атрезия кишечника, уретры и мочеточников, ахондроплазия, гастрошизис, гепатомегалия, гидронефроз, гидроцефалия, дефекты нервной трубки, диафрагмальная грыжа, клеточные гигромы, лимфангиомы, мало- и многоводие, микроцефалия,

омфалоцеле, полидактилия, поликистоз почек, пороки головного и лицевого черепа, наружных половых органов, пороки сердца, предлежание и отслойка плаценты, расщелины верхней губы, мягкого и твердого нёба, скелетная дисплазия, сиреномиелия, тератомы.

Электро(эхо)кардиография плода. Применяется для диагностики врожденных пороков сердца в III триместре беременности.

Другие методы профилактики

Диагностика гетерозиготных состояний

Необходимость определения гетерозиготного носительства патологических генов вытекает из правил диагностики МБ, наследуемых по рецессивному типу. Целью такой диагностики является идентификация семей, имеющих высокий риск рождения больных потомков, что крайне важно при решении вопросов планирования семьи.

Известны три класса гетерозиготных носителей, выявление которых имеет значение:

- носители генов аутосомно-рецессивных заболеваний с высокой частотой проявления в некоторых этнических группах (бетаталассемия, болезнь Тея-Сакса, серповидноклеточная анемия и, возможно, МВ);
- носители генов Х-сцепленных рецессивных заболеваний (гемофилия А и В, миодистрофия Дюшенна и Беккера);
- носители генов аутосомно-доминантных заболеваний, выявляемых на прееклинической стадии (миотоническая дистрофия, хорей Гентингтона).

Диагностика гетерозиготных состояний осуществляется с помощью популяционно-статистического метода, методов аналитической биохимии и молекулярно-генетических методов (см. главу 19). Такая диагностика предусматривает использование традиционного врачебного осмотра как самого пробанда, так и его больных и здоровых родственников (с целью выявления микропризнаков основного заболевания у родителей и сибсов больного пробанда). При этом следует помнить, что результаты врачебного осмотра нередко сложно трактовать, ибо начальные и стертые формы рецессивного заболевания могут давать одинаковую клиническую картину.

Диспансеризация

Диспансеризация больных с наследственной патологией - это система целенаправленных мероприятий, проводимых на всех

уровнях организации медико-генетической помощи населению и регулируемых нормативными и методическими документами Минздравсоцразвития России. В числе этих мероприятий:

- отбор на основе диагностических программ контингентов больных и их семей, подлежащих диспансеризации;
- определение организационных форм текущего наблюдения (частота наблюдения в зависимости от характера патологии, возраста и состояния больного);
- определение объемов клинико-лабораторных и специальных методов исследования (осмотры врачами разных специальностей по показаниям);
- определение комплекса лечебно-оздоровительных мероприятий, способствующих оптимальному развитию больных детей;
- оказание медико-социальной помощи больному пробанду (профессиональная ориентация и социальная адаптация в зависимости от характера патологии, определение соответствия состояния здоровья критериям инвалидизации).

Система диспансеризации также предусматривает осуществление планового динамического наблюдения за ближайшими родственниками больных детей (родителями, сибсами), по отношению к которым применяется весь комплекс диагностических мероприятий и средств, способствующих раннему выявлению аналогичных заболеваний, определению гетерозиготного носительства генов болезни, проспективному и ретроспективному МГК.

Необходимой основой функционирования системы диспансеризации является преемственность наблюдения за больным пробандом на разных уровнях оказания специализированной помощи, особенно преемственность деятельности акушерской, педиатрической и медико-генетической служб. С этой целью разрабатываются новые формы медицинской документации, карты диспансерного наблюдения за больным ребенком и членами его семьи (генетический вкладыш в историю болезни, генетическая карта, карта фенотипа и др.), передаточный (этапный) эпикриз из детской поликлиники во взрослую, карты генетической информации для родителей, врачей и посетителей женских консультаций и родильных домов, извещающие о высоком риске рождения больного ребенка и т.п.

Реальной перспективой улучшения диспансерного наблюдения за семьями больных с наследственной патологией является создание региональных (федеральных) регистров на основе компьютерных баз

данных о состоянии здоровья больных пробандов и их ближайших родственников, а в дальнейшем - создание геномного и протеомного паспорта каждого больного индивида (см. главу 1).

Искусственное осеменение спермой донора

Применяется в семьях, в которых отмечается высокий риск развития заболеваний с аутосомно-рецессивным наследованием. Суть метода заключается в оплодотворении яйцеклетки спермой генетически здорового донора, получаемой из Банка спермы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Завершая обзор направлений, подходов, способов и видов профилактики наследственной патологии, следует отметить, что в развитых странах ее эффективность четко связана с

уровнем перинатальной смертности детей, которая не должна превышать 17-18%, что объясняется не только выбором подходов (путей) профилактики, но и вниманием к ним со стороны государств этих стран. Совершенно ясно, что усилий одного только здравоохранения явно недостаточно (например, вопросы охраны окружающей среды медики решить не в состоянии).

Ясно также, что вопросы планирования семьи и репродукции надо решать не только путем запретов или, наоборот, разрешений на медицинские аборт, но также путем повышения эффективности контрацептивных препаратов. В первую очередь следует пропагандировать генетические знания среди населения и самих врачей, а также своевременно информировать их о возможностях молекулярной медицины по лечению и предупреждению наследственной патологии.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ I

Карта фенотипа пробанда

Ф.И.О. _

ПОЛ _

ДАТА РОЖДЕНИЯ И ВОЗРАСТ ДАТА ОСМОТРА Череп

Форма черепа

1. Брахицефальная
2. Долихоцефальная
3. Гидроцефальная
4. Акроцефальная
5. Эллипсоидная
6. Овоидная
7. Пентагоидная
8. Сфероидная
9. Сфеноидная
10. Другие признаки Окружность головы
1. Микроцефалия
2. Макроцефалия
3. Другие признаки Особенности волосистой части головы
1. Низкий рост волос на лбу
2. Низкий рост волос на затылке
3. Алопеция (вид)

4. «Мыс вдовы»

5. Структура волос

6. Другие признаки Лицо

Лоб

1. Высокий

2. Узкий

3. Выступающие лобные бугры

4. Выступающий метопический шов Надбровные дуги

1. Массивные надбровные дуги

2. Гипоплазия надбровных дуг

3. Другие признаки Брови

1. Отсутствие бровей

2. Особенности роста

3. Синофриз

4. Другие признаки Ресницы

1. Отсутствие ресниц

2. Дистихиаз

3. Тристихиаз

4. Особенности роста

5. Другие признаки Орбитальный регион

1. Гипертелоризм

2. Гипотелоризм

3. Монголоидный разрез глаз

4. Антимонголоидный разрез глаз

5. Эпикант

6. Телекант

7. Птоз

8. Косоглазие (вид)

9. Энофтальм

10. Экзофтальм

11. Особенности глазного яблока

12. Особенности роговицы
13. Особенности хрусталика
14. Особенности радужки
15. Другие признаки

Нос

1. Длинный
2. Короткий
3. Гипоплазия крыльев носа
4. Асимметрия крыльев носа
5. Широкая спинка носа
6. Широкий кончик носа
7. Седловидный нос
8. Клювовидный нос
9. Грушевидный нос
10. Девиация оси носа
11. Другие признаки

Ушные раковины

1. Микротия
2. Макротия
3. Низко расположенные ушные раковины
4. Высоко расположенные ушные раковины
5. Асимметричные ушные раковины
6. Оттопыренные ушные раковины
7. Ухо «сатира»
8. Ухо «макаки»
9. Насечки на мочке
10. Серьговидная мочка
11. Приросшая мочка
12. Околоушные придатки
13. Ротированные кзади ушные раковины
14. Плохая дифференцировка структурных элементов
15. Другие признаки

Ротовая область и полость

1. Фильтр длинный
2. Фильтр короткий
3. Микростомия
4. Макростомия
5. Расщелина губы (вид)
6. «Карпий» рот
7. Тонкая верхняя губа
8. Микрогения (малые размеры нижней челюсти)
9. Макрогения (большие размеры нижней челюсти)
10. Микрогнатия (малые размеры верхней челюсти)
11. Макрогнатия (большие размеры верхней челюсти)
12. Прогнатия (выдвинутое положение верхней челюсти)
13. Прогения (выдвинутое положение нижней челюсти)
14. Ретрогнатия (смещение назад верхней челюсти за счет уменьшения ее размеров)
15. Расщелина нёба (вид)
16. Высокое готическое нёбо
17. Высокое арковидное нёбо
18. Расщелина язычка
19. Макроглоссия
20. Микроглоссия
21. Складчатый язык
22. Дополнительные уздечки
23. Другие признаки Шея
 1. Короткая
 2. Длинная
 3. Толстая
 4. Кривошея (вид)
 5. Крыловидные складки (вид)
6. Другие признаки Грудная клетка
 1. Широкая
 2. Асимметричная

3. Воронкообразная

4. Килевидная

5. Гипертелоризм сосков

6. Дополнительные соски

7. Аплазия грудины

8. Гипоплазия грудины

9. Состояние реберных дуг

10. Другие признаки Живот

1. Пупочная грыжа

2. Паховая грыжа

3. Грыжа белой линии живота

4. Расширение пупочного кольца

5. Омфалоцеле

6. Другие признаки Позвоночник, спина

1. Укорочение туловища (аномальная форма позвонков и др.)

2. Асимметрия позвонков, несмыкание дужек

3. Искривление позвоночника (сколиоз, кифоз, лордоз)

4. Крыловидные лопатки

5. Пилонидальная ямка (гипертрихоз, ангиомы, липомы и др.)

6. Межъягодичный дермальный синус

7. Рентгенологические особенности

8. Внешние проявления в области скрытого дефекта

9. Другие признаки Половые органы

1. Половой член (увеличение, уменьшение)

2. Яички (уменьшение, увеличение)

3. Клитор (уменьшение, увеличение)

4. Малые половые губы (уменьшение, увеличение)

5. Большие половые губы (уменьшение, увеличение)

6. Крипторхизм (вид)

7. Гипоспадия (вид)

8. Эписпадия

9. Фимоз

10. Другие признаки Туловище в целом

1. Асимметрия

2. Макросомия

3. Микросомия

4. Нанизм (вид)

5. Гигантизм

6. Гемигипоплазия (вид)

7. Гемигипертрофия (вид)

8. Ожирение (вид)

9. Липодистрофия

10. Другие признаки Конечности и суставы

1. Укорочение конечностей (вид). Особенности стопы:

2. Асимметрия конечностей. Особенности кисти:

3. Брахидактилия

4. Арахнодактилия

5. Синдактилия (вид)

6. Клинодактилия

7. Полидактилия (вид)

8. Олигодактилия (вид)

9. Особенности дерматоглифики

10. Врожденная косолапость (вид)

11. Акромикрия

12. Сандалевидная щель

13. Плоскостопие

14. Гипермобильность суставов

15. Тугоподвижность суставов

16. Врожденные вывихи

17. Врожденные контрактуры

18. Другие признаки Кожа и кожные придатки

1. Гиперэластическая кожа

2. Вялая кожа
3. Гипертрихоз
4. Гипотрихоз
5. Гирсутизм
6. Гиперкератоз
7. Кожные проявления (невусы, «кофейные» пятна, витилиго, телеангиэктазии, ангиомы и др.).
8. Особенности ногтей
9. Аномалии количества зубов
10. Атипичное расположение зубов
11. Атипичная форма зубов
12. Нарушение прорезывания зубов
13. Диастема
14. Другие признаки

Общее количество выявленных аномалий

Из них: БАР_

МАР_

Дополнительные данные

1. Степень гипотрофии
2. ЗВУР (задержка внутриутробного развития):
 - отставание массы тела по отношению к гестационному возрасту
 - отставание массы тела по отношению к росту_
 - трофические нарушения кожи (тонкий подкожно-жировой слой)
 - снижение тургора_

Варианты ЗВУР (гипопластический, гипотрофический, диспластический)

3. Нарушение гомеостаза_
4. Изменение иммунологической реактивности_
5. Изменение функционального состояния ЦНС_
6. Другие изменения_

Предполагаемый диагноз:

Моногенные пороки_

Наследственный синдром

Множественные ВПР_

Мультифакториальные пороки_

Пороки средового происхождения_

Пороки при хромосомных нарушениях_

Пороки неустановленного генеза_

Рекомендуемое дообследование:

1. Параклиническое_

2. Генетическое (кариотипирование, ДНК-диагностика, специальные биохимические исследования)_

3. Другое_

Окончательный диагноз_

Рекомендации_

ПРИЛОЖЕНИЕ II

ОРГАНИЗАЦИЯ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ В РОССИИ

Как следует из приказа Минздрава РФ от 30 декабря 1993 года ?316, медико-генетическая служба в России объединяет 85 медикогенетических центров, консультаций и кабинетов, в которых работают около 350 врачей-генетиков и врачей-лаборантов-генетиков.

Эта служба включает следующие уровни организации:

Районный (городской) уровень

Врач-генетик ЦРБ или врач районной (городской) поликлиники.

Задачи: выявление и учет семей, отягощенных врожденной и наследственной патологией, их направление в региональное медикогенетическое учреждение, диспансерное наблюдение за лицами с выявленной патологией, пропаганда медико-генетических знаний.

Региональный уровень

МГК на базе областной, краевой или республиканской больницы (республики в составе Российской Федерации).

Задачи: консультирование семей и больных с наследственной патологией с применением генеалогического анализа, синдромологического подхода и цитогенетических методов исследования; пренатальный скрининг беременных женщин на распространенные хромосомные болезни и ВПР ЦНС (на основе УЗИ и оценки материнских сывороточных маркеров - АФП, ХГЧ); пренатальная цитогенетическая диагностика хромосомных болезней в группах риска (женщины старше 35 лет); селективный скрининг семей и больных на НБО; организационное обеспечение массового неонатального скрининга

новорожденных на 5 НБО (совместно с акушерами и педиатрами); направление пациентов со сложными случаями наследственной патологии в межрегиональную МГК или федеральный медико-генетический центр (МГЦ); ведение территориального регистра семей и больных с наследственной патологией и их диспансерное наблюдение; пропаганда медико-генетических знаний.

Межрегиональный уровень

Межрегиональный МГЦ на базе отраслевого НИИ или областной (краевой, республиканской) МГК, обслуживающий 3-5 соседних регионов.

Задачи: те же, что на региональном уровне, и дополнительно - массовый неонатальный скрининг новорожденных на 5 НБО; подтверждающая диагностика, консультирование и диагностика сложных случаев патологии по направлениям областных МГК; организация лечения больных с адреногенитальным синдромом, врожденным гипотиреозом, галактоземией, муковисцидозом и фенилкетонурией.

Федеральный уровень

Федеральный МГЦ (в том числе специализированный) на базе научных учреждений, медицинских вузов и крупных больниц федерального подчинения.

Задачи: консультирование при сложных случаях патологии, подтверждающая цитогенетическая, биохимическая и молекулярно-генетическая диагностика в сложных и редких случаях; разработка, апробация и внедрение новых методов диагностики, лечения и реабилитации, подготовка кадров для медико-генетических учреждений и повышение квалификации сотрудников последних, контроль качества их работы, организация лечения детей с выявленными НБО, ведение федерального регистра семей и больных с редкой врожденной и наследственной патологией.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Глава 1

1. Назовите дату рождения генетики как науки и имя основателя.
2. Сформулируйте предмет медицинской (клинической) генетики.
3. Что такое геномика и протеомика?
4. В чем состоит вклад отечественных ученых в развитие медицинской и клинической генетики? Приведите примеры.
5. Перечислите основные этапы в истории развития теории гена. С какими открытиями они были связаны?
6. Каковы перспективы дальнейшей расшифровки повторяющихся нуклеотидных последовательностей ДНК у человека? Какие возможности за ними стоят?
7. Перечислите основные достижения международной научной программы «Геном человека» (1988-2005).
8. Что такое прямая и обратная генетика?
9. Изложите содержание концепции клинической протеогеномики в молекулярной медицине.

10. Что обозначает термин «генетизация человечества»? Объясните.

Глава 2

1. Назовите уровни организации наследственного материала и дайте их краткую характеристику.
2. Что известно о химическом строении молекул ДНК и РНК? Почему молекулу ДНК называют главной молекулой жизни?
3. Как организована хромосома? Назовите ее компоненты.
4. Что известно о структуре и типах митохондриальной ДНК? Что такое гетероплазмия и гомоплазмия?
5. Какие понятия относятся к основным понятиям структурной геномики?
6. Сформулируйте понятия: ген, гаплотип, генотип, гомеостаз, кариотип, генетический (геномный) полиморфизм.
7. Перечислите свойства гена как единицы функционирования.
8. Что такое репродуктивный процесс у человека? В чем состоит его биологический смысл?
9. Что такое генофонд? Назовите его особенности.
10. Генетический груз человека как одно из свойств генофонда, дайте определение? Какая патология относится к генетическому грузу?

Глава 3

1. Что такое экспрессия генов?
2. Назовите функции белков и изложите содержание концепции модульного фолдинга?
3. Что такое прионный белок?
4. Перечислите основные понятия протеомики.
5. Сформулируйте понятия: «признак», «патологический признак», «фенотип», «патологический фенотип».
6. Какие понятия относятся к понятиям клинической протеомики?
7. Что такое болезнь, патокинез и прогрессивность?
8. Что такое наследственная болезнь, врожденная болезнь, клинический, тератологический и хромосомный синдром?
9. Сформулируйте понятия «врожденный порок развития» и «малая аномалия развития»? Что такое стигма дизэмбриогенеза?
10. Что такое клинический полиморфизм? Назовите уровни его проявления.

Глава 4

1. Назовите варианты и типы наследования генов и признаков.

2. Сформулируйте законы наследственности.
3. Сформулируйте основные положения хромосомной теории наследственности.
4. Перечислите критерии моногенного наследования.
5. Перечислите критерии полигенного наследования.
6. Какие классы патологии человека относятся к варианту нетрадиционного наследования генов и признаков?
7. Назовите механизмы взаимодействия между аллельными генами.
8. Назовите механизмы взаимодействия между неаллельными генами.
9. Ответьте, с помощью каких механизмов взаимодействуют отдельные гены в составе генотипа как единой системы. Приведите примеры.
10. Приведите примеры заболеваний, основанных на механизмах генокопирования, аллельных серий и фенокопирования.

Глава 5

1. Что такое фенотипика?
2. Назовите основные классы изменчивости наследственного материала, признаков и фенотипа организма.
3. Когда начинает функционировать геном человека? Что такое изменчивость при оплодотворении гамет?
4. Что такое норма и диапазон реакции? Приведите примеры.
5. Ненаследственная изменчивость - когда она происходит? Приведите примеры?
10. Что такое деградация белков? Какова роль белка убиквитина?

Глава 8

1. Основные секреты молекулярной жизни клетки и организма - назовите их.
2. Что такое аллостерическая регуляция и ковалентная модификация белка?
3. Как осуществляется регуляция клеточной активности? Что такое ДНК-связывающие факторы? Приведите примеры.
4. Что такое рецептор-опосредованная сигнализация?
5. Как осуществляется передача межклеточных и внутриклеточных сигналов?
6. Какие молекулы относятся к сигнальным молекулам? Сколько их? Приведите примеры.
7. Какую роль для клетки и организма играют гормоны, рафты, цитокины, регуляторные факторы развития и другие сигнальные молекулы?
8. Что такое интерлейкины и интерфероны? Их роль и значение.
9. Какую роль для клетки и организма играют факторы некроза опухолей и нейромедиаторы?

10. Что такое эргические системы? Приведите примеры наиболее известных эргических систем.

Глава 9

1. Назовите условия нормального функционирования клетки.
2. Что такое жизненный цикл клетки? Приведите краткую характеристику.
3. Перечислите особенности митоза.
4. Перечислите особенности мейоза.
5. Назовите причины и укажите возможные механизмы повреждения структурных компонентов клетки при разных заболеваниях.
6. Что такое перекисное окисление липидов?
7. Что такое мембранная липидная матрица?
8. Назовите причины нарушений первичной структуры ДНК.
9. Какую роль играют лизосомальные гидролазы в повреждении клетки? Приведите примеры заболеваний.
10. Какую роль играют продукты расщепления фосфолипидов в повреждении клетки? Приведите примеры заболеваний.

Глава 10

1. Назовите формы гибели клетки. Какие критерии гибели клетки Вы знаете?
2. Приведите общую характеристику апоптоза и его молекулярно-биохимические критерии.
3. Какую роль в апоптозе играют фосфолипиды и другие соединения клетки?
4. Какую роль играют сигнальные каскады в инициации и трансдукции апоптотического сигнала? Назовите эти каскады.
5. Что такое апоптотические тельца?
6. Приведите характеристику некроза и его молекулярно-биохимические критерии.
7. Назовите отличия апоптоза от некроза.
8. Приведите общие свойства апоптоза и некроза.
9. Обратимость повреждений при некрозе - возможна ли она? Что можно считать обратимой стадией?

Глава 11

1. Какие защитные и восстановительные системы имеются в организме? Их роль и значение.
2. Какие системы клетки и организма участвуют в детоксикации ксенобиотиков?
3. Какую роль играют в организме системы детоксикации с участием цитохрома P₄₅₀?

4. Как осуществляется в организме детоксикация гидроперекисей фосфолипидов?
5. Что такое окислительно-стрессорный сигналинг?
6. Что такое система детоксикации с помощью супероксиддисмутазы?
7. В чем состоит антиоксидантная роль крови?
8. С помощью каких механизмов обеспечивается восстановление клеточных мембран после повреждения?
9. Что такое ингибиторы мутагенеза?
10. Перечислите системы репарации ДНК. Сколько их описано в литературе?

Глава 12

1. Что представляет собой генетическая программа онтогенеза с молекулярных позиций? Что такое потенциал молекулы ДНК?
2. Какие закономерности относятся к биологическим закономерностям онтогенеза?
3. Прогресс и регресс в ходе онтогенеза. Что обозначают эти понятия?
4. Назовите этапы и периоды онтогенеза.
5. Какие гены человека относятся к генам раннего развития? Какая патология с ними связана?
6. Назовите уровни регуляции синтеза белковых продуктов онтогенеза.
7. Какую роль в онтогенезе играет ангиогенез?
8. Что такое критический период онтогенеза? Приведите примеры.
9. Какие факторы относятся к основным факторам онтогенеза?
10. Что такое онтогенетическое здоровье, геномное, протеомное и репродуктивное здоровье человека?

Глава 13

1. Что представляет собой нервная ткань? Охарактеризуйте её морфологический и функциональный субстраты.
2. Что такое нейроонтогенез? Назовите его этапы.
3. Перечислите основные события антенатального этапа нейроонтогенеза.
4. Какие основные события в клетке и организме относятся к постнатальному нейроонтогенезу?
5. Что такое долговременный адаптационный период?
6. Назовите молекулярные механизмы реализации межнейронных связей.
7. Перечислите закономерности информационного обеспечения коры больших полушарий головного мозга.

8. Приведите примеры нарушений нейроонтогенеза в результате первичного поражения перивентрикулярной области и сочетанных поражений мозга.
9. Приведите примеры нарушений развития психоневрологических функций организма.
10. Какие заболевания относятся к первичным нейрогенетическим болезням?

Глава 14

1. Приведите краткую характеристику организации и функционирования эндокринной системы. Подтвердите соответствующими примерами единство эндокринной, экзокринной и нервной систем организма.
2. Приведите особенности онтогенеза гипоталамуса и гипофиза. Назовите их основные гормоны, ткани-мишени и функции.
3. Приведите особенности онтогенеза щитовидной и паращитовидных желез.
4. Назовите гормоны надпочечников.
5. Назовите основные функции и гормоны поджелудочной железы.
6. Приведите примеры транзиторных метаболических и гормональных нарушений у человека.
7. Что такое синдром дыхательной недостаточности и синдром гормонального криза?
8. Опишите механизмы транзиторного гипотиреоза и гипертиреоза.
9. Какая симптоматика характерна для врожденного гипотиреоза?
10. Приведите характеристику адреногенитального синдрома.

Глава 15

1. Приведите краткую характеристику организации и функционирования иммунной системы. Назовите примеры единства иммунной, нервной и эндокринной систем организма.
2. Какие органы относятся к первичным и вторичным лимфоидным?
3. Что такое иммунный ответ организма? Перечислите основные реакции и нарушения иммунного ответа.
4. Межклеточная кооперация в ходе иммунного ответа - что это такое?
5. Что такое неспецифическая резистентность и иммунологическая толерантность?
6. Приведите общую характеристику главного комплекса гистосовместимости.
7. Какие рецепторы относятся к антигенраспознающим?
8. Как инициируется иммунный ответ цитотоксической Т-клеткой? Опишите его механизм.

Глава 16

1. Что такое репродуктивный процесс человека? Назовите его основные звенья.

2. На каких этапах онтогенеза происходит развитие органов репродуктивной системы человека? Начало каких событий приходится на внутриутробный онтогенез?
3. Что такое онтогенез биологического пола? Как формируются мужской и женский пол?
4. Назовите уровни дифференцировки пола и приведите примеры нарушений генетического, гаметного и гонадного пола.
5. Что такое гормональный и соматический пол?
6. Что такое психический, социальный и гражданский пол?
7. Приведите классификацию генетических нарушений репродукции.
8. Перечислите генетические причины бесплодия.
9. Приведите классификацию генетических причин мужского бесплодия.
10. Приведите классификацию генетических причин женского бесплодия.

Глава 17

1. Что такое генетический груз и в чем состоит его опасность для человечества?
2. Перечислите формы наследственной патологии у человека.
3. Показатели здоровья современного человека, структура и объем его факторов.
4. Какие характерные признаки позволяют врачу выделить наследственную патологию?
5. Приведите основные достижения в исследованиях причин и механизмов развития моногенных болезней.
6. Приведите основные достижения в исследованиях причин и механизмов развития мультифакториальных заболеваний.
7. Назовите основные причины и механизмы развития хромосомных синдромов.
8. Назовите основные причины и механизмы врожденных пороков и малых аномалий развития.
9. Какова роль нарушений взаимодействия генов, регулирующих клеточный цикл?
10. Назовите причины и механизмы развития онкогенных болезней.

Глава 18

1. Изложите содержание методики обследования больных с наследственной патологией.
2. Какие методы включает первый этап диагностики наследственной патологии?
3. Назовите особенности первичного приема врача.
4. Назовите особенности и значение клинико-генеалогического метода.
5. Каково содержание метода объективного врачебного осмотра, почему его так называют. Какая наука является его методической основой?
6. Что такое семиотика и синдромологический метод обследования?

7. Особенности врачебного осмотра при врожденных аномалиях развития. Что такое карта фенотипа пробанда?
8. Изложите общее содержание близнецового метода. Его роль и значение в медицине.
9. Какие методы относятся к методам преимплантационной и пренатальной диагностики? Приведите их краткую характеристику.
10. Что такое метод предварительного клинического диагноза на основе компьютерных баз данных? Какие программы вы можете назвать?

Глава 19

1. Кратко изложите содержание методики обследования больных с наследственной патологией на втором этапе диагностики.
2. Роль и значение в диагностике наследственной патологии популяционно-статистического метода.
3. Какие методы относятся к специальным лабораторным методам обследования больных с наследственной патологией?
4. Что такое аналитические системы и программные продукты?
5. Какие методы относятся к молекулярно-генетическим методам геномики и протеомики? На чем они основаны?
6. Какое значение для диагностики наследственной патологии имеют методы анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и микросателлитных последовательностей?
7. Какие методы относятся к методам молекулярно-генетической (молекулярно-цитогенетической) диагностики хромосомных синдромов и врожденных аномалий развития?
8. Кратко изложите характеристику методов химического расщепления некомплементарных сайтов и тестирования неполноценного белка.
9. Что такое денатурирующая жидкостная хроматография высокого разрешения? Какое значение для диагностики она имеет?
10. Что такое методы ДНК-чипов? Их содержание и значение.

Глава 20

1. Какие принципы лечения характерны для современной молекулярной медицины?
2. Что такое этиологическая терапия? Изложите подходы к ней, проблемы и перспективы.
3. Что такое генотерапия и клеточная терапия?
4. Что такое регенераторная медицина, клеточная и тканевая инженерия?
5. Что такое генетическая вакцина?
6. Приведите краткую характеристику дендритных и стволовых клеток.
7. Что такое нанотехнологии и наноматериалы?

8. Нанобиотехнологии и наномедицина, их роль и значение.
9. Что такое нанопротеомика? Кратко охарактеризуйте, что скрыто под понятиями «нанодиагностикум», «биосенсор», «молекулярный детектор».
10. Этические проблемы терапии наследственной патологии, поясните, что это такое. Какое значение они имеют для молекулярной и субмолекулярной медицины?

Глава 21

1. Приведите общую характеристику моногенных болезней.
2. Что такое наследственные болезни обмена веществ? Перечислите показания для их лабораторной диагностики.
3. Приведите примеры наиболее распространенных моногенных болезней.
4. Назовите основные симптомы муковисцидоза.
5. Назовите основные симптомы фенилкетонурии.
6. Назовите основные симптомы галактоземии.
7. Что такое болезни накопления, дайте их краткую характеристику. Приведите примеры этих болезней.
8. Что такое мукополисахаридозы и характерный для них гаргоилический дисморфизм?
9. Приведите краткую характеристику сфинголипидозов. Назовите основные симптомы болезни Тея-Сакса.
10. Приведите примеры редких липидозов. Назовите основные симптомы болезни Гоше.

Глава 22

1. Дайте определение и приведите общую характеристику мультифакториальных заболеваний.
2. Что такое наследственная предрасположенность и порог подверженности?
3. Дайте определение наследуемости и приведите примеры основных моделей наследования.
4. Что такое ассоциация и сцепление с маркерами мультифакториальных заболеваний?
5. Назовите молекулярно-генетические механизмы развития артериальной гипертензии.
6. Назовите молекулярно-генетические механизмы развития атеросклероза. Что такое синтропические конгломераты болезней?
7. Что является молекулярно-генетической основой развития бронхолегочных болезней? Недостаточность альфа-1-антитрипсина - это симптом или заболевание?
8. Изложите основные молекулярно-генетические критерии развития бронхиальной астмы.
9. Что сегодня известно о причинах и патогенезе сахарного диабета? Дайте краткую характеристику заболевания.

10. Молекулярно-генетическая и инфекционная теории развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки - какой из них вы отдадите предпочтение и почему?

Глава 23

1. Приведите исторические сведения о развитии тератологии в России.
2. Что такое порок развития - дайте определение.
3. Изложите принципы классификаций БАР и МАР.
4. В чем заключается дифференциально-диагностическое значение МАР?
5. Приведите примеры наследственных синдромов МВПР и дайте их краткую характеристику (минимальные диагностические признаки и фенотип)?
6. Приведите симптоматику синдрома Аарского-Скотта.
7. Приведите симптоматику синдрома Беквитта-Видемана.
8. Приведите симптоматику синдрома Корнелии де Ланге.
9. Назовите клинические формы истинного мужского и женского гермафродитизма.
10. Назовите клинические формы мужского и женского псевдогермафродитизма.

Глава 24

1. Что такое хромосомный синдром? Дайте общую характеристику.
2. Приведите доказательства связей хромосомного дисбаланса с нарушениями развития организма.
3. Перечислите показания для цитогенетической диагностики хромосомных синдромов.
4. Назовите основные клинические признаки синдромов Дауна, Патау и Эдвардса.
5. Назовите основные клинические и цитогенетические признаки синдромов «кошачьего крика» и Вольфа-Хиршхорна.
6. Назовите основные клинические признаки синдрома моносомии 18p- и частичной моносомии 13q-.
7. Приведите примеры гоносомных синдромов с мужским фенотипом.
8. Приведите примеры гоносомных синдромов с женским фенотипом?
9. Назовите основные клинические признаки синдрома полисомии по X-хромосоме.
10. Назовите основные клинические признаки синдрома полисомии по Y-хромосоме.

Глава 25

1. Что такое онкогенные болезни и почему они относятся к наследственной патологии человека? Какова их природа?
2. Назовите частоту онкогенных болезней у детей и взрослых.
3. Что такое протонкогены?

4. Что такое гены-супрессоры опухолевого роста?
5. Назовите компоненты пускового механизма опухолевого роста.
6. Что такое двухударная модель канцерогенеза? Поясните.
7. Какова роль эпигенетической регуляции экспрессии генов в клетках опухоли?
8. Назовите значение метилирования генов, вовлеченных в канцерогенез?
9. Перечислите основные направления ДНК-диагностики рака.
10. Приведите общую характеристику молекулярных механизмов опухолевого ангиогенеза.

Глава 26

1. Происхождение и наследование пероксисом и митохондрий - что вам об этом известно?
2. Что такое пероксисомы? Приведите их общую характеристику.
3. Что такое пероксисомные болезни? Приведите их общую характеристику.
4. Приведите примеры пероксисомных болезней.
5. Какие подходы существуют в диагностике пероксисомных болезней?
6. Назовите подходы к лечению пероксисомных болезней.
7. Приведите общую характеристику митохондрий.
8. Приведите общую характеристику и примеры митохондриальных болезней.
9. Какие подходы известны в диагностике митохондриальных болезней?
10. Назовите подходы к лечению митохондриальных болезней.

Глава 27

1. Приведите общую характеристику повторяющихся последовательностей ДНК.
2. Что такое экспансия нуклеотидных повторов ДНК?
3. Перечислите универсальные и уникальные особенности феномена экспансии.
4. Молекулярные механизмы феномена экспансии, что вам о них известно?
5. Изложите краткое содержание репликативной, комбинативной и рекомбинационной моделей экспансии. Какой из них отдается наибольшее предпочтение?
6. Что Вам известно о причинно-следственных связях при болезнях экспансии?
7. Назовите события, сопутствующие механизму экспансии.
8. Приведите краткую характеристику болезней экспансии, связанных с полиглутаминовыми и полиаланиновыми трактами.
9. Приведите примеры болезней экспансии некодирующих повторов.
10. Назовите подходы к диагностике и лечению болезней экспансии.

Глава 28

1. Что такое геномная память? Приведите краткую характеристику.
2. Приведите краткую характеристику болезней геномной памяти.
3. Приведите классификацию, назовите причины и механизмы патогенеза болезней геномного импринтинга.
4. Чем отличаются болезни генного импринтинга от болезней хромосомного импринтинга?
5. Что такое болезни ошибок импринтинга?
6. Назовите причины и приведите симптоматику синдромов Ангельмана и Прадера-Вилли.
7. Назовите причины и приведите симптоматику синдрома Бек-витта-Видемана.
8. Какова роль геномного импринтинга в развитии опухолей и других заболеваний?
9. Назовите подходы к диагностике болезней импринтинга.
10. Назовите подходы к лечению болезней импринтинга.

Глава 29

1. Приведите краткую характеристику прионных белков.
2. Изложите содержание концепции белков-прионов и приведите ее экспериментальные доказательства.
3. Перечислите свойства прионных белков.
4. Назовите межвидовые ограничения при инфицировании белками-прионами.
5. Приведите краткую характеристику прионных болезней. Чем они опасны для человека?
6. Назовите причины и механизмы патогенеза прионных болезней.
7. Назовите основные признаки прионных болезней.
8. Приведите характеристику наиболее известных нозологических форм прионных болезней.
9. Почему наследственную болезнь Альцгеймера можно рассматривать как прионную болезнь?
10. Назовите подходы к диагностике и лечению прионных болезней.

Глава 30

1. Роль и место профилактики наследственной патологии в медицине.
2. Назовите основные направления и подходы к профилактике наследственной патологии.
3. Изложите краткую характеристику генотипического направления профилактики.
4. Изложите краткую характеристику фенотипического направления профилактики.

5. Перечислите отдельные виды (методы) профилактики наследственной патологии.
6. Что такое медико-генетическое консультирование, его роль и значение в медицине?
7. Что такое пренатальная диагностика?
8. Что такое прееклиническая диагностика?
9. Назовите задачи, решаемые с помощью искусственного осеменения спермой донора.
10. Назовите задачи, решаемые с помощью диагностики гетерозиготных состояний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Акифьев А.П. Евгеника: прошлое и будущее: юбилейный сборник научных трудов кафедры клинической генетики ФУВ РГМУ «Актуальные проблемы современной клинической генетики» / под ред. Г.Р. Мутовина, Л.Ф. Марченко. - М.: ИМБХ РАМН, 2001. - С. 52-60.

Баранов В.С., Иващенко Т.Э., Исаев М.В. Молекулярные основы наиболее частых моногенных болезней // Геномика - медицине. Научное издание / под ред. В.И. Иванова, Л.Л. Киселева. - М.: Академкнига, 2005. - С. 74-99.

Билева Дж.С. Нехромосомная наследственность // Генетика / под ред. В.И. Иванова: учебник для вузов. - М.: Академкнига, 2006. - С. 273-290.

Блинникова О.Е. Семиотика наследственных болезней. Альманах «Исцеление». - М.: Тривола, 2000. - Вып. 4. - С. 108-113.

Блинникова О.Е., Пахомов Д.В., Селиванова Е.А., Мутовин Г.Р. Современные генотерапевтические технологии в лечении болезней человека: учебнометодическое пособие / под ред. Г.Р. Мутовина, И.А. Скворцова. - М.: Тривола, 2001. - 24 с.

Бочков Н.П. Клиническая генетика: учебник для вузов. - 2-е изд. перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. - 448 с.

Васильев В.Б. Митохондриальные болезни // Геномика - медицине. Научное издание / под ред. В.И. Иванова, Л.Л. Киселева. - М.: Академкнига,

2005. - С. 137-149.

Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский образовательный журнал. - 2000. - ? 12. - С. 13-19.

Геномика - медицине. Научное издание / под ред. В.И. Иванова, Л.Л. Киселева. - М.: Академкнига, 2005. - 392 с.

Глазер В.М. Конверсия гена // Соросовский образовательный журнал. - 2000. - Т. 6, ? 1. - С. 23-31.

Гуттман Б., Гриффитс Э, Сузуки Д., Куллис Т. Генетика / пер. с англ. О. Перфильева. - М.: Гранд-Фаир, 2004. - 448 с.

Дадали Е.Л., Барышникова Н.В. Генетика широко распространенных заболеваний // Генетика / под ред. В.И. Иванова: учебник для вузов. - М.: Академкнига, 2006. - С. 545-556.

Дадали Е.Л., Барышникова Н.В. Наследственные болезни обмена // Генетика / под ред. В.И. Иванова: учебник для вузов. - М.: Академкнига, 2006. -

С. 541-544.

Дрожжисин А.П., Кукес В.Г., Сычев Д.А. Основы клинической фармакогенетики // Введение в молекулярную медицину / под ред. М.А. Пальцева. - М.: Медицина, 2004. - С. 191-236.

Зарецкая Ю.М., Хамагонова Е.Г., Губарев М.И. Иммунология и иммуногенетика человека. - М.: Триада, 2002. - 128 с.

Иванов В.И., Барышникова Е.В., Билева Дж.С. и др. Генетика: учебник для вузов / под ред. В.И. Иванова. - М.: Академкнига, 2006. - 639 с.

Иванов В.И., Ижевская В.Л. Геномика и этика // Геномика - медицине / под ред. В.И. Иванова, Л.Л. Киселева. - М.: Академкнига, 2005. - С. 349-360.

Ипатова О.М. Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике / под ред. А.И. Арчакова. - М.: Изд. ГУ НИИ биомедицинской химии РАПМН, 2005. - 318 с.

Киселев В.И. Генотерапия: состояние и перспективы развития // Введение в молекулярную медицину / под ред. М.А. Пальцева. - М.: Медицина, 2004. - С. 237-271.

Клиническая иммунология и аллергология: пер. с англ. / под ред. Г. Лолорамладшего, Т. Фишера, Д. Адельмана. - М.: Практика, 2000. - 806 с.

Краснопольская К.Д. Наследственные болезни обмена веществ: Справочное пособие для врачей. - М.: Центр социальной адаптации и реабилитации детей «Фохат», 2005. - 364 с.

Курникова М.А. Клиническое и молекулярно-генетическое исследование классического типа синдрома Элерса-Данлоса: Дисс. канд. мед. наук / РГМУ. - М., 2007. - 123 с.

Лисица А.В. База знаний по цитохромам P₄₅₀: разработка и применение: автореф. дис. д-ра биол. наук. - М.: ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН им. В.Н. Ореховича, 2007. - 44 с.

Луценко С.В., Киселев С.М., Фельдман Н.Б., Северин С.Е. Молекулярные механизмы ангиогенеза в физиологических и патологических процессах // Введение в молекулярную медицину / под ред. М.А. Пальцева. - М.: Медицина,

2004. - С. 446-494.

Макаров О.В., Ковальчук Л.В. и др. Невынашивание беременности, инфекция, врожденный иммунитет. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 175 с.

Марусин А.В. Изменчивость и наследуемость антиоксидантной активности плазмы крови в сибирских популяциях: Автореф. дисс. канд. мед. наук - Томск: НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, 2001. - 22 с.

Медведева Н.В., Ипатова О.М., Иванов Ю.Д. и др. Нанобиотехнологии и наномедицина // Биомед. химия. - 2006. - Т. 52, ? 6. - С. 529-546.

Мутовин Г.Р. Основы клинической генетики: учебное пособие. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Высшая школа, 2001. - 234 с.

Мутовин Г.Р., Иванова О.Г. Геномное здоровье человека, молекулярная медицина и клиническая протеогеномика // Вестн. РГМУ. - 2005. - ? 2(41). - С. 39-45.

Немцова М.В., Залетаев Д.В. Эпигенетические нарушения экспрессии генов и наследственная патология у человека // Введение в молекулярную медицину / под ред. М.А. Пальцева. - М.: Медицина, 2004. - С. 94-146.

Носиков В.В. Генетика сахарного диабета типа 1 // Геномика - медицине / под ред. В.И. Иванова, Л.Л. Киселева. - М.: Академкнига, 2005. - С. 281-311.

Пузырев В.П., Огородова Л.М. Геномная медицина в решении проблем пульмонологии // Вестн. РАМН. - 2000. - ? 7. - С. 28-33.

Пузырев В.П., Степанов В.А., Фрейдин М.Б. Молекулярные основы мультифакториальных заболеваний // Геномика - медицине. Научное издание / под ред. В.И. Иванова, Л.Л. Киселева. - М.: Академкнига, 2005. - С. 100-136.

Разумов А.Н., Пономаренко В.А., Пискунов В.А. Здоровье здорового человека (основы восстановительной медицины) / под ред. В.С. Шинкаренко. - М.: Медицина, 1996. - 441 с.

Ревич-Щербо И.В., Марютина Т.М., Григоренко Е.Л. Психогенетика: учебник для вузов / под ред. И.В. Ревич-Щербо. - М.: Аспект-пресс, 2000. - 448 с.

Рис Э, Стернберг М. Введение в молекулярную биологию (от клеток к атомам): пер. с англ. / под ред. Ю.С. Лазуркина, В.А. Ткачука. - М.: Мир, 2002. - 142 с.

Ройт А., Бростофф Дж, Мейл Д. Иммунология. - М.: Мир, 2000. - 592 с.

Самуилов В.Ф. Биохимия запрограммированной клеточной гибели (апоптоза) животных // Соросовский образовательный журнал. - 2001. - ? 7. - С. 18-25.

Скворцов И.А. Патология нервной системы и нарушения развития психоневрологических функций при наследственных заболеваниях и хромосомных синдромах: учебно-методическое пособие РГМУ / под ред. Г.Р. Мутовина. - М.: ИРИК Тривола, 2001. - 37 с.

Скворцов И.А. Развитие нервной системы у детей (нейроонтогенез и его нарушения) / Научно-терапевтический центр профилактики и лечения психоневрологической инвалидности. - М.: Тривола, 2000. - 208 с.

Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский образовательный журнал. - 2001. - ? 7. - С. 4-10.

Сорокина Т.И. Структура наследственной патологии у лиц с нарушением формирования и/или функционирования органов репродуктивной системы: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - М.: МГНЦ РАМН, 2006. - 24 с.

Стрельников В.В., Залетаев Д.В. Молекулярные механизмы этиопатогенеза болезней экспансии повторяющихся последовательностей // Геномика - медицине. Научное издание / под ред. В.И. Иванова, Л.Л. Киселева. - М.: Академкнига, 2005. - С. 150-178.

Хорошая И.В. Клинико-генетические аспекты модифицирующей роли основных белков мембран эритроцитов в этиопатогенезе язвенной болезни желудка: Автореф. дисс. канд. мед. наук. - М.: РГМУ, 2006. - 25 с.

Черных В.Б., Курило Л.Ф. Генетический контроль дифференцировки пола у человека // Генетика. - 2001. - Т. 37, ? 10. - С. 1317-1329, 1475-1485.

Черных В.Б., Курило Л.Ф. Синдром персистенции мюллеровых протоков (обзор литературы) // Пробл. репродукции. - 2001. - Т. 7, ? 4. - С. 20-24.

Шевченко В.А., Топорнина Н.А., Стволинская Н.С. Генетика человека: учебник для вузов. - 2-е изд. испр. и доп. - М.: Владос, 2004. - 240 с.

Шкундина И.С., Тер-Аванесян М.Д. Прионы // Успехи биологической химии. - М., 2006. - Т. 46. - С. 3-42.

Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология: учебное пособие: пер. с англ. / под ред. А.И. Арчакова. - М.: Наука/Интерпериодика, 2002. -

444 c.

Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004, 286, 189-196.

Cummings C.J., Zoghbi H.Y. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases // *Hum. Mol. Genet.* - 2000. - Vol. 1, N 2. - P. 281-328.

Dennis C., Gallagher R. Fireword by J.D. Watson. The Human Genome, Nature pal grave. - Cambridge: Produced in association with Book Production Consultants, Printed and bound in Italy, 2001. - 140 p.

Enari M., Flechsig E., Weissmann C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2001. -

Vol. 98. - P. 92-95.

Griffiths A.J.F., Miller G.H., Suzuki D.T., Levontin R. An Introduction to Genetic

Analysis. - 7th ed. - N.Y., 2000. - P. 365-371, 510-517, 626-628.

Gut I.G. Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms // *Hum. Mutat.* - 2001. - Vol. 17. - P. 475-492.

Hilbert D.W. Transcription factors and cancer: an overview // *Toxicology.* - 2002. - Vol. 181-182. - P. 131-141.

Janssens S., Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition // *Clin. Microbiol. Rev.* - 2003. - Vol. 16, N 4. - P. 637-646.

Jimenez-Sanchez G., Childs B., Vallle D. Human disease genes // *Nature.* - 2001. -

Vol. 409, N 6822. - P. 853-855.

Killian J.A., van Meer G. The «double life» of membrane lipids // *EMBO Rep.* - 2001. - Vol. 21. - P. 91-95.

Lee W.M. Drug-induced hepatotoxicity // *N. Engl. J. Med.* - 2003. - Vol. 349. -

P. 474-485.

Lenzmeier B.A., Freudenreich C.H. Trinucleotide repeat instability: a hairpin curve at the crossroads of replication, recombination, and repair // *Cytogenet. Genome Res.* - 2003. - Vol. 100. - P. 7-24.

Murphy S.K., Jirtle R.L. Imprinting evolution and the price of silence // *Bioes-*

says. - 2003. - Vol. 25. - P. 577-588.

Ohara K. Anticipation, imprinting, trinucleotide repeat expansion and psychosts // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* - 2001. - Vol. 25. - P. 167-192. *Peretz D., Williamson R.A., Kaneko K. et al.* // *Nature.* - 2001. - Vol. 412. -

P. 739-743.

Shaw W., Mclean M.A., Sligar S.G. Phospholipid phase transition in homogeneous nanometer scale dilayers discs // *FEBS Lett.* - 2004. - Vol. 556. - P. 260-264.

Xiao W., Oefner P.J. Denaturing high-performance liquid chromatography; a review // Ibid. - 2001. - N 17. - P. 439-474.

Источники электронной информации

Cell Structure and Functions: Lipid Membranes. <http://scidiv.bcc.ctc.edu/rkr/Biology101/lectures/pdfs/>.

European Center of Biotechnology Information <http://scrs.ebi.ac.uk>. National Center of Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.gov/omim>.

www.biochemistry.ru.

<http://obi.img.ras.ru/humbio/immunology>.

<http://rmj.ru/rmj>.

<http://www.hla.ru/stat.htm>.

<http://www.nature.ru/db/msq>.

<http://www.pathology.dn.ua/lecturesw/ImmuneAnormal>.
<http://www.xumuk.ru/biologhim/0/22.html>. <http://www.mig.pccenter.ru/immdef>.
<http://www.nature.ru/db/msq>.